

# EINFLUSS DER STIMULATION NIKOTINERGER REZEPTOREN AUF DIE ENDOTHELIALE PTHRP- EXPRESSION UND DIE ENDOTHELIALE SUSZEPTIBILITÄT GEGENÜBER APOPTOSE

ANJA RÖTHIG

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. J. Roth

und

dem Physiologischen Institut  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. K-D. Schlüter

**Einfluss der Stimulation nikotinerger Rezeptoren  
auf die endotheliale PTHrP-Expression und die  
endotheliale Suszeptibilität gegenüber Apoptose**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

am Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**ANJA RÖTHIG**

Tierärztin aus Marburg

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

---

Gutachter:

Prof. Dr. J. Roth

---

Prof. Dr. K.-D. Schlüter

---

Tag der Disputation:

30.06.2009

---

Wer sein Ziel kennt, findet den Weg.

LAOTSE

**meiner Familie gewidmet**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, im März 2009

Anja Röthig

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Physiologische und pathophysiologische Grundlagen des Parathyroid-hormone-related-Peptide.....	1
1.1.1	Allgemeines zu PTHrP.....	1
1.1.2	PTHrP im kardiovaskulären System.....	4
1.2	Erläuterung zu Nikotin und dem nikotinergen Acetylcholin Rezeptor .....	6
1.3	Apoptose .....	10
1.3.1	Bedeutung und Charakteristika der Apoptose .....	10
1.3.2	Mechanismus der Apoptose .....	11
1.4	Aufgabenstellung .....	15
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>17</b>
2.1	Chemikalien.....	17
2.1.1	Häufig verwendete Chemikalien.....	17
2.1.2	Chemikalien für den Apoptose-Assay.....	20
2.1.3	Chemikalien für RT-PCR und real-time PCR.....	20
2.1.4	Primer für RT-PCR und real-time PCR.....	21
2.1.5	Antikörper für Immunoblots.....	21
2.2	Geräte und Laborbedarf .....	22
2.2.1	Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	22
2.2.2	Sonstige Geräte.....	23
2.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.2.4	Software.....	24
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1	Isolierung von koronaren Endothelzellen.....	25
3.1.1	Versuchstiere.....	25
3.1.2	Präparation von mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Rattenherz .....	25



3.1.3	Passage von mikrovaskulären Endothelzellen .....	28
3.2	Zellinduktion .....	29
3.3	Zellernte.....	29
3.3.1	Zellernte für den Western-Blot.....	29
3.3.2	Zellernte für PCR und RT-PCR .....	30
3.4	RNA-Isolierung aus Endothelzellen für PCR und RT-PCR .....	30
3.5	DNA-Behandlung.....	31
3.6	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	32
3.7	cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	33
3.8	RT-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) und Real-time PCR.....	34
3.8.1	Einführung in die Methode.....	34
3.8.2	Real-Time PCR.....	38
3.8.3	Auswertung der PCR .....	41
3.9	SDS-Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen .....	43
3.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	43
3.9.2	Western-Blot.....	46
3.9.3	Dot blot .....	48
3.9.4	Immunfärbung.....	49
3.10	Apoptose Assay.....	50
3.11	Spontan hypertensive Ratten als <i>In vivo</i> -Modell.....	52
3.12	Auswertung und Statistik .....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1	Effekt einer nAChR Stimulierung auf die PTHrP-Expression.....	53
4.1.1	Der Einfluss von unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen auf die PTHrP-Expression.....	53
4.1.2	Expression von nACh-Rezeptoren in mikrovaskulären Endothelzellen .....	54
4.1.3	Einfluss der spezifischen und unspezifischen Hemmung der nAChR auf die PTHrP-Expression .....	55

4.1.4	Beteiligung von MAP-Kinasen an der nikotinerg aktivierten Signaltransduktion.....	56
4.1.5	Effekt der p38-MAP-Kinase Hemmung auf die Nikotin stimulierte PTHrP-Expression.....	58
4.2	Auswirkung von Nikotin auf die Apoptose-Suszeptibilität in Endothelzellen .....	60
4.2.1	Bestimmung der Apoptoserate mit dem Hoechst-Assay .....	60
4.2.2	Untersuchung pro- und anti-apoptotischer Gene.....	61
4.2.3	Auswirkung der Nikotinstimulierung auf den PTHrP-Rezeptor .....	63
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
5.1	Hauptbefunde .....	67
5.2	Nikotinerg vermittelte Steigerung der PTHrP-Expression .....	67
5.3	Die p38-MAP-Kinase vermittelt die nikotinerg induzierte Steigerung der PTHrP-Expression .....	69
5.4	Nikotin wirkt pro-apoptotisch auf isolierte Endothelzellen .....	70
5.5	Schlussfolgerung .....	73
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>88</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
A $\beta$	Amyloid beta
ACh	Acetylcholin
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Zweifach demineralisiertes Wasser
$\alpha$ -BTX	$\alpha$ -Bungarotoxin
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol (0,1M)
EDHF	Endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular regulated kinase
FCS	Fetales Kälberserum
Fw-primer	Forward primer

HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hoe 33258	Hoechst Farbstoff
IE	Internationale Einheit
JNK	c-Jun amino-terminale Kinase
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IU	international unit, Internationale Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
Kbp	Kilobasenpaare
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
nAChR	Neuronaler nicotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Neonatales Kälberserum
NBT	Nitro blue tetrazolium
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD98059	2-Amino-3-Methoxyflavone
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration

## Verzeichnis der Abkürzungen

---

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid-hormone-related-peptide
PTH1R	Parathormon-Rezeptor 1
RT	Reverse Transkription
Rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.e.m.	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	Spontan hypertensive Ratten
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
x g	x-fache Erdbeschleunigung
% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologische und pathophysiologische Grundlagen des Parathyroid-hormone-related-Peptide

### 1.1.1 Allgemeines zu PTHrP

In den 80igern gelang es erstmals, die Ursache für die bei Tumorerkrankungen auftretende maligne Hyperkalzemie aufzuklären. Nachdem längere Zeit das Schilddrüsenhormon PTH als Ursache diskutiert wurde, gelang es, ein strukturverwandtes Protein zu identifizieren. Dieses ist in der Lage die PTH Wirkungen zu imitieren, weshalb es als Parathyroid-hormone-related-peptide, kurz PTHrP, bezeichnet wurde (Burtis et al., 1987, Moseley et al., 1987, Stewler et al., 1987). PTH und PTHrP sind Produkte unterschiedlicher Gene, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Das PTHrP kodierende Gen wird als „early gene“ klassifiziert, da die PTHrP mRNA eine kurze Halbwertszeit von 30 Minuten bis zu 3 Stunden besitzt und schnell induzierbar ist (Schlüter et al., 2006). Beim Menschen besitzt das kodierende Gen für PTHrP neun Exons. Dadurch können bis zu zwölf Transkriptionsprodukte und (im Gegensatz zu Ratte und Maus, bei denen nur ein Translationsprodukt entsteht) drei initiale Translationsprodukte entstehen. Durch Glykosylierung, Phosphorylierung und proteolytische Spaltung werden diese nach der Translation weiter modifiziert. Dabei entstehen drei biologisch aktive Fragmente: ein N-terminales PTHrP(1-36), ein mittregionales PTHrP(38-94) und ein C-terminales PTHrP(107-139). Die Regulation der Expression ist noch nicht vollends geklärt, in Endothelzellen reguliert TGF $\beta$  die PTHrP-Expression herab (Wenzel et al., 2001), wohingegen TGF $\beta$  in proliferierenden Chondrozyten und Keratinozyten sowie in Ovarialkarzinomen die Expression heraufreguliert (Pateda et al., 2000; Werkmeister et al., 1998; Yasui et al., 1997). Die Freisetzung des PTHrP erfolgt gewebe- beziehungsweise zellspezifisch. In Endothelzellen erfolgt die Freisetzung durch mechanische Stimuli, ein Absinken des Sauerstoffpartialdruckes oder durch  $\alpha$ 1-Adrenozeptoragonisten (Schorr et al., 2003).

Obwohl PTH und PTHrP Produkte unterschiedlicher Gene sind, weisen sie eine hohe strukturelle Homologie im N-terminalen Bereich auf. Dies ist auch ursächlich für die

ähnlich kalzitrope Wirkung von PTH und PTHrP auf Niere und Knochen. Im Laufe der Zeit wurden PTHrP weitere Funktionen, sowohl unter physiologischen wie auch unter pathophysiologischen Bedingungen, zugeordnet. PTHrP spielt unter anderem eine Rolle in der Embryonalentwicklung, zum Beispiel bei der Entwicklung des Skelettsystems, der enchondralen Ossifikation; aber auch bei der Entwicklung der Mamma, des kardialen Systems und der Lungenreifung (Schlüter und Ross, 2006).

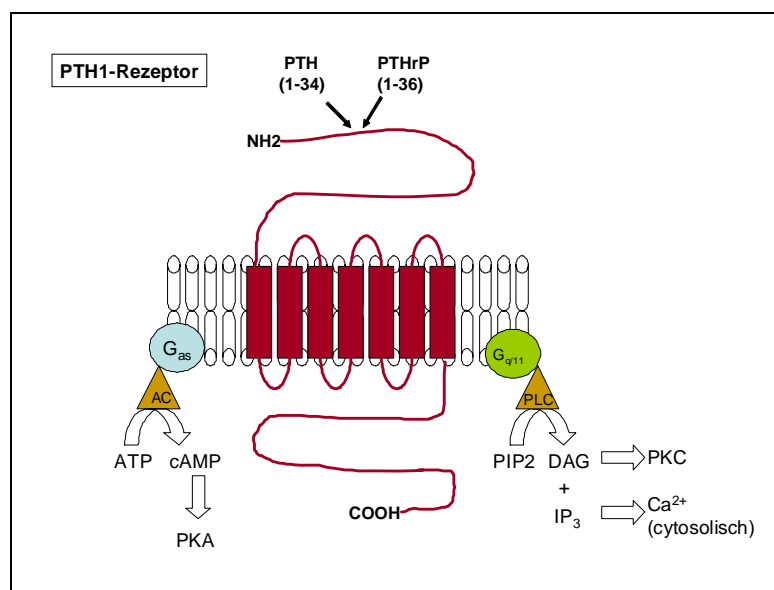
Während PTH nur in der Nebenschilddrüse, im Gehirn und Thymus produziert wird (Günther et al., 2000), wird PTHrP ubiquitär im Körper exprimiert. Man kann es in der Haut, im Knochenmark, im ZNS, in der Niere, im kardiovaskulären System, aber auch in der glatten Muskulatur von Magen, Blase und Uterus nachweisen. Die Plasmakonzentrationen von PTHrP liegen normalerweise unter 1,3 pmol/l, diese Werte werden nur in der Laktation oder unter pathophysiologischen Bedingungen überschritten. Auf Grund der niedrigen Konzentrationen werden PTHrP hauptsächlich lokale Wirkungen zugeschrieben, die autokrin, parakrin oder intrakrin vermittelt sind. Das C-Terminale Peptid des PTHrP ist auch unter dem Name Osteostatin bekannt und hemmt die osteoklastenvermittelte Knochenresorption. Diese Wirkung wird über einen eigenen Rezeptor vermittelt, dessen genaue Struktur und Signalweg bislang noch nicht genau identifiziert sind (Schlüter und Ross, 2006).

PTH und PTHrP agieren aufgrund ihrer Strukturhomologie über den gleichen Rezeptor. Es sind mittlerweile drei verschiedene Rezeptortypen identifiziert worden. Der PTH1-Rezeptor, auch als PTH/PTHrP-Rezeptor bezeichnet, wird durch die N-terminale Region des Agonisten aktiviert. Er zeichnet sich durch eine hohe Affinität für beide Proteine, die im nanomolaren Konzentrationsbereich liegen, aus. Der Rezeptor wird in den verschiedensten Geweben exprimiert, eine starke Expression findet man in Niere und Knochen. Hier vermittelt er die klassisch kalzitrope Wirkung des PTH (Schlüter & Ross, 2006). Der PTH1-Rezeptor (Abb. 1-1) gehört zu der Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Er besitzt sieben transmembranale Domänen und ist an zwei verschiedene Signalwege gekoppelt. Über ein  $G_{\alpha s}$ -Protein kann er die Adenylatzyclase aktivieren, was zu einem Anstieg des Cyclo-Adenosinmonophosphats und der Aktivierung der Proteinkinase A führt. Des Weiteren ist der PTH1-Rezeptor in der Lage, über ein  $G_{q/11}$ -Protein die Phospholipase C zu aktivieren, dadurch kommt es zu einer Freisetzung von Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin aus der Plasmamembran. Dies führt zu einer Steigerung des intrazellu-

lären Calciums und erhöht die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinase C in der Zellmembran.

Die meisten Effekte jedoch werden über den cAMP/PKA-Signalweg vermittelt. Auch in der Pathogenese einiger Erkrankungen scheint der PTH1-Rezeptor eine Rolle zu spielen: beim Krankheitsbild des Hyperparathyroidismus, der malignen Hyperkalzämie und der Osteoporose (Schlüter & Ross, 2006).

Der PTH2-Rezeptor, der nicht durch PTHrP aktiviert werden kann, wurde hauptsächlich im Zentralnervensystem nachgewiesen. Der natürliche Ligand an diesem Rezeptor ist TIP39, ein weiteres Mitglied der PTH/PTHrP-Familie. Der PTH3-Rezeptor wurde bisher nur im Zebrafisch gefunden und konnte noch nicht in Säugetierzellen detektiert werden (Rubin u. Juppner, 1999).



**Abb. 1-1 Schema des PTH1-Rezeptors (modifiziert nach Schlüter und Ross, 2006)**

Erstmals wurde PTHrP in Lungentumorzellen entdeckt und als Auslöser für die, häufig im Rahmen von Tumorerkrankungen auftretende, maligne Hyperkalzämie ermittelt. Das Peptid wird von den Tumorzellen konstitutiv freigesetzt und führt zu deutlich erhöhten Plasmakonzentrationen. Die erhöhten Plasmaspiegel sind oftmals ein Zeichen für die Malignität des Tumors und bedeuten nicht selten eine schlechte



Prognose. Zu den häufigsten Tumoren, die PTHrP sezernieren, gehören Tumore der Mamma, Lungentumore, und Prostata Tumore (Schlüter & Ross, 2006).

Schließlich konnten Kubota et al. 2002 zeigen, dass auch bei Tumorerkrankungen des Hundes, mit einhergehender Hyperkalzämie, erhöhte PTHrP-Konzentrationen im Plasma nachweisbar sind. Auch bei der Katze scheinen einige Tumorarten, vor allem Karzinome, PTHrP freizusetzen und damit eine Hyperkalzämie auszulösen (Bolliger et al., 2002).

### **1.1.2 PTHrP im kardiovaskulären System**

Im adulten Herzen findet man die höchste Bildung von PTHrP im Vorhofmyokard und den kardialen Gefäßen (Burton et al., 1994). Exprimiert wird PTHrP in den atrialen Kardiomyozyten, in den Endothelzellen und in glatten Muskelzellen. Zielzellen für PTHrP im adulten Organismus sind atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten, Schrittmacherzellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Die Regulation der PTHrP-Expression ist abhängig vom Zelltyp. Die schnelle und transiente Expressionssteigerung in vaskulären Glattmuskelzellen erfolgt durch vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II, Serotonin, Endothelin, Noradrenalin, und Thrombin (Pirola et al., 1993) und mechanische Stimuli (Noda et al., 1994; Pirola et al., 1994). In Endothelzellen wird die PTHrP-Expression durch  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren stimuliert (Schorr et al., 2003) und durch TGF $\beta$  herabreguliert (Wenzel et al., 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass auch in Endothelzellen spontan hypertensiver Ratten die Expression von PTHrP initial gesteigert ist (Noda et al., 1997), bevor sie TGF- $\beta_1$ -abhängig wieder reprimiert wird (Wenzel et al., 2001).

An isoliert perfundierten Rattenherzen hat PTHrP positiv chrono- (Schlüter & Piper, 1998) und inotrope Effekte am postischämischen Herzen (Jansen et al., 2003). Dagegen ist PTH nur in der Lage einen positiv chronotropen Effekt zu vermitteln. Die positive Inotropie wird durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase in ventrikulären Kardiomyozyten ausgelöst (Nickols et al., 1989; Schlüter et al., 1997). Außerdem kommt es durch PTHrP an isoliert perfundierten Rattenherzen zu einer aus-

geprägteren Steigerung des koronaren Perfusionsflusses als durch PTH (Nickols et al., 1989).

Das C-terminale Fragment des PTHrP, besonders PTHrP<sub>107-111</sub>, führt in Kardiomyozyten zu einem Anstieg der Proteinsynthese, der totalen Proteinmasse, des Zellvolumens und langfristig zu einem hypertrophen Wachstum (Schlüter et al., 1997). Das C-terminale Peptid wirkt hier an den adulten Kardiomyozyten wie ein Wachstumsfaktor. Die Steigerung der Proteinsynthese erfolgt durch die Proteinkinase C und die mitogen activated protein (MAP) Kinase. Die MAP-Kinase steigert die Aktivität der fetalen Kreatinkinase-Isoform Kreatinkinase BB (Ck-BB). Diese wird bei kardialer Hypertrophie erneut exprimiert (Schlüter et al., 1997).

Über eine Stimulation des PTH1-Rezeptors und die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs kommt es zur Relaxation der glatten Muskelzellen (Massfelder & Helwig 2003). Dadurch hat PTHrP im kardialen System eine vasodilatierende Wirkung und einen Einfluss auf den lokalen Blutfluss (Nickols et al., 1989). Durch die niedrigen Plasmakonzentrationen und die kurze Halbwertszeit kann diesem Effekt aber nur eine lokale Bedeutung zugeschrieben werden. Qian et al. konnten 1999 zeigen, dass transgene Mäuse, die PTHrP in der glatten Muskulatur überexprimieren, einen niedrigeren systemischen Blutdruck haben. Auch eine Überexpression des PTH1R in vaskulären Glattmuskelzellen führt zu einem verminderten systemischen Blutdruck.

In koronaren Endothelzellen wird PTHrP während einer Ischämie freigesetzt (Schlüter et al., 2000) und verbessert signifikant die Erholungsphase in der Reperfusion (Lütke et al., 2005). Außerdem setzt PTHrP den koronaren Gefäßwiderstand im Rattenherz herab. Dieser Effekt wird nicht über den klassischen Weg der PTH/PTHrP-Rezeptor Aktivierung vermittelt, sondern über einen EDHF-abhängigen Mechanismus. PTHrP reduziert den Gefäßwiderstand über eine Endothelzellhyperpolarisation (Abdallah et al., 2006). Jedoch zeigten Massfelder & Helwig 2003, dass möglicherweise auch ein NO-abhängiger Signalweg des PTHrP in Endothelzellen existiert. Eine weitere wichtige Funktion hat PTHrP bei der Apoptosesuszeptibilität der Endothelzellen, hier reguliert es über Bcl-2 die Apoptosrate herab (Schorr et al., 2003).

Auch bei der Embryonalentwicklung des kardialen Systems kommt PTHrP eine wichtige Funktion zu. Ab dem elften Tag der Embryonalentwicklung kann PTHrP und

der korrespondierende PTH1R in fetalen Ratten nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Entwicklung des Herzens und der großen Gefäße. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass transgene PTHrP- und PTH1R-überexprimierende Mäuse bereits intrauterin während dieser Entwicklungsphase versterben. Bei diesen Tieren konnte eine deutliche Fehlbildung des Herzens nachgewiesen werden (Qian et al., 1999).

## **1.2 Erläuterung zu Nikotin und dem nikotinergen Acetylcholin Rezeptor**

In Deutschland sterben jährlich zwischen 90.000 und 140.000 Menschen an den Folgen des Tabakkonsums. Allein ca. 400 dieser Todesfälle sind bedingt durch Folgen des "Passivrauchens" (Peto et al., 1994). Häufig auftretende Erkrankungen, die durch das Rauchen begünstigt werden, sind Krebserkrankungen (ca. 43.000 der Todesfälle) Kreislauferkrankungen (rund 37.000 der Todesfälle) und Atemwegserkrankungen (mit einem Anteil von ca. 20.000 an den Todesfällen). Für das Jahr 1997 wurden ungefähr 143.000 tabakbedingte Todesfälle angenommen (John und Hanke, 2001). Im Jahr 2003 wurden 115.000 tabakbedingte Todesfälle geschätzt (Neubauer et al., 2006).

Zigarettenrauch enthält über 4.000 Stoffe, einer der Hauptbestandteile ist Nikotin. Die Nikotinmenge in einer Zigarette liegt bei ca. 12 Milligramm. Der Rauch einer Zigarette enthält im Durchschnitt je nach Marke zwischen 0,1 und 1,0 mg Nikotin.

Nikotin ist ein natürliches Alkaloid, das aus der Pflanze *Tabacum nicotiana* gewonnen wird. Das Nikotin wird in den Wurzeln gebildet und wandert dann während des Reifungsprozesses in die Blätter. Seine Wirkung entfaltet Nikotin als natürlicher Agonist des Acetylcholins am nikotinergen Acetylcholinrezeptor. Der natürliche Ligand Acetylcholin aktiviert zwei verschiedene Rezeptortypen: die muskarinergen und die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Der nAChR ist ein membranständiger Ionenkanal mit einer pentameren Struktur. Man unterscheidet den muskulären nAChR, der aus vier Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  oder  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) gebildet wird, und den neuronalen Rezeptor. Der neuronale Rezeptor hingegen wird nur aus zwei verschiedenen

Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) gebildet. Die nAChR können eine homomere oder eine heteromere Struktur aufweisen. Es gibt neun verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_8$  wurde bisher nur in Geflügel nachgewiesen (Lindstrom, 2000)) und drei verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ). Die große Anzahl verschiedener Untereinheiten führt zu einer großen Variabilität des nAChR bzgl. seiner Bindungseigenschaften, der Liganden-Spezifität, der Kationen Permeabilität und Reaktionskinetik (Buisson et al., 2000). Die Bindungsdomäne für Acetylcholin liegt auf den  $\alpha$ -Untereinheiten: bindet der Ligand an den Rezeptor, führt dies zu einer Konformationsänderung und der Kanal öffnet sich. Dadurch kommt es zum Einstrom von  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  und zum Ausstrom von  $\text{K}^+$  (Steinbach, 1990). Die  $\alpha_7$ -nAChR-Untereinheiten können einen homo-oligomeren nAChR bilden, der eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Permeabilität aufweist als andere nAChR (Vernino et al., 1994; Albuquerque et al., 1997). Zusätzlich kann der  $\alpha_7$ -nAChR auch durch Cholin aktiviert werden, schon lange nachdem Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase abgebaut wurde. Damit können auch längerfristige Effekte vermittelt werden (Seguela et al., 1993; Albuquerque et al., 1997). Ursprünglich wurde dieser Rezeptortyp nur in Nervenzellen und dem Gehirn gefunden. Mittlerweile konnten auch auf nicht neuronalen Zellen funktionelle nAChR nachgewiesen werden: nAChR des  $\alpha_3$ -Subtyps werden auf humanen bronchialen Epithelzellen und Endothelzellen der Aorta exprimiert. Diese spielen eine Rolle in der Modulation der Zellform und den Zell-zu-Zellkontakten (Macklin et al., 1998; Maus et al., 1998). Außerdem konnten  $\alpha_7$ -nAChR in den Epithelzellen der Bronchien und in Endothelzellen der Aorta detektiert werden (Wang et al., 2001).

Viele wissenschaftliche Studien haben sich mit den Wirkungen des Nikotins beschäftigt. So wurde gezeigt, das Nikotin zu morphologischen und funktionellen Veränderungen am vaskulären Endothel führt (Moccia et al., 2003).

Die Nikotinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ , äquivalent zu den Plasmakonzentrationen, die nach dem Konsum von einem Päckchen Zigaretten am Tag erreicht werden, stimuliert den Übergang in die S-Phase in humanen Endothelzellen der Aorta, humanen mikrovaskulären Endothelzellen und Epithelzellen der kleinen Atemwege (Dasgupta et al., 2006). Außerdem stimulieren schon geringe Dosen Nikotin ( $<10^{-8}$ , unterhalb der Plasmakonzentration von Rauchern) die DNA-Synthese in Endothelzellen und die Zellproliferation in vitro. Höhere Konzentrationen ( $>10^{-6}$ ) des Nikotins erwiesen sich allerdings als cytotoxisch für das Endothel (Villablanca, 1998).

Auch auf die Apoptoseempfindlichkeit hat Nikotin einen Einfluss. Hakki et al. konnten 2002 zeigen, dass Nikotin die Apoptoserate in humanen coronaren Endothelzellen signifikant reduziert (Hakki et al., 2002). Was im Falle von Tumorerkrankungen unerwünscht ist, könnte im Herzen von Bedeutung sein. Die ausdifferenzierten Kardiomyozyten besitzen nur eine geringe Möglichkeit der Regeneration. Viele Herzkrankungen gehen mit einer erhöhten cardialen Apoptoserate einher, so dass das Fortschreiten der Erkrankung begünstigt wird (Kang et al., 2000). Untersuchungen am Herzen haben festgestellt, dass niedrige Konzentrationen von Nikotin (10-25 ng/ml) die LPS-induzierte Apoptose reduzieren können (Suzuki et al., 2003).

Konträr zu diesen Studien konnten Heeschen et al. 2001 zeigen, dass Nikotin die Angiogenese fördert. In dem verwendeten Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass Nikotin sowohl bei Entzündungen als auch bei Ischämie, Atherosklerose und Tumorerkrankungen zu einer verstärkten Angiogenese führt.

Nikotin wird auch als Therapeutikum für Alzheimer Erkrankung, Parkinson, Tourette Syndrom und ulzerative Colitis diskutiert (Benowitz et al., 1996; Sandborn et al., 1999). In Deutschland leiden ca. 1 Millionen Menschen an einer Demenzerkrankung, davon ca. 700.000 an Alzheimer (Patientenleitlinien/Demenz, Universität Witten/ Herdecke). Histopathologisch kommt es bei der Alzheimer-Krankheit einmal zu einem massiven Verlust von Neuronen im limbischen System und im cerebralen Cortex (Kernekewisch, 1999). Außerdem treten schwerwiegende Veränderungen in dem Gefäßsystem auf. Es kommt zu einer Rarefizierung der Gefäße, einer veränderten Struktur der Endothelzellen und zu einer Degeneration von glatten Muskelzellen. Die Veränderungen am Gefäßsystem gehen oft der kognitiven Beeinträchtigung voraus, so dass sie vermutlich eine Rolle in der Pathogenese der Demenz spielen. An Mäusen, die das amyloid precursor Protein des veränderten Proteins A $\beta$  überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass sie eine massive Dysregulation der zerebralen Zirkulation aufwiesen (Girouard & Iadecola, 2006).

Seit mehreren Jahren wird die Beteiligung von nAChR an degenerativen Erkrankungen vermehrt postuliert (O'Neill et al., 2002). Dies wird bestärkt durch den post-mortem Fund, dass nAChR in Gehirnen von Alzheimer Patienten reduziert waren (Burghaus et al., 2000). In den Gehirnregionen, die für das Lern- und Erinnerungsvermögen verantwortlich sind, ist Acetylcholin der Neurotransmitter an den Synapsen

(Woolf, 1996). Die dominanten nicotinergen Rezeptorsubtypen, die im Gehirn vorkommen, sind  $\alpha 7$  und  $\alpha 4\beta 2$  (Wevers & Schroder, 1999; Wevers et al., 1999). Aus diesem Grund wurden seit einigen Jahren in der Therapie der Alzheimer Erkrankung Acetylcholinesterase-Hemmer eingesetzt. Durch die Hemmung dieses Enzyms wird die Verweildauer des Acetylcholins im synaptischen Spalt erhöht und so die Menge des Acetylcholins im Gehirn gesteigert (Ibach & Haen, 2004). Das progressive Vorschreiten der degenerativen Veränderungen in den Regionen des Erinnerungsvermögens kann so zeitweise verlangsamt werden (Oddo et al., 2005).

Charakteristisch für die Alzheimer Erkrankung sind unlösliche, proteinhaltige Ablagerungen vor allem im Hippocampus, in der Großhirnrinde und im Hirnstamm, die sogenannten Amyloid-Plaques (Alzheimer, 1907; Katzman, 1986; Reisberg 1983). Außerdem kommt es zur Bildung von neurofibrillären Bündeln (neurofibrillary tangles) in Axonen, Dendriten und Nervenendigungen, bestehend aus dem in pathologischer Weise veränderten mikrotubuliassoziierten Protein Tau (Goedert et al., 1991; Trojanowski & Lee, 1994).

Der Einsatz von Nikotin in der Alzheimer Therapie wird kontrovers diskutiert. Nordberg et al. haben 2002 gezeigt, dass in transgenen Mäusen mit Amyloid- $\beta$  Bildung durch chronische Nikotingabe die Amyloid-Plaques reduziert wurden. Im Gegensatz dazu steht die Studie von Oddo et al. 2005, die gezeigt hat, dass Nikotin die Phosphorylierung und Anlagerung von Tau Proteinen fördert. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Nikotin und andere nAChR Agonisten das Lern- und Erinnerungsvermögen steigern (Grutzendler & Morris, 2001).

Eine Studie in den Niederlanden konnte einen Zusammenhang zwischen familiärer Alzheimer Erkrankung und Rauchen herstellen: Raucher erkrankten weniger häufig an Alzheimer (Dujin & Hofman, 1991). Eine neue Studie im Jahr 2008 bestätigte eine negative Korrelation zwischen Rauchen und der Entwicklung einer neurodegenerativen Erkrankung. Nikotin zeigte hier eine neuroprotektive Wirkung, sowohl in vivo als auch in vitro (Picciotto et al., 2008). Hier werden weitere Studien zur Klärung notwendig sein.

## 1.3 Apoptose

### 1.3.1 Bedeutung und Charakteristika der Apoptose

Zellerneuerung und Zelluntergang sind essentielle Vorgänge während der Entwicklung des Organismus. Aber auch im adulten Organismus spielen sie eine wichtige Rolle, z.B. bei der Verjüngung von Geweben (z.B. Riechepithel), der Kontrolle von Zellzahl und Größe eines Gewebes und der Beseitigung von entarteten Zellen. Der Untergang einer Zelle kann durch zwei Vorgänge initiiert werden, nämlich Apoptose und Nekrose.

Apoptose, der „programmierte Zelltod“, ist ein energieabhängiger Vorgang, der mit typischen morphologischen Veränderungen der Zelle einhergeht. Ausgelöst werden kann Apoptose durch eine Vielzahl von Stimuli z.B. virale Infektionen, Bestrahlung, Toxine und Chemikalien. Unter die „physiologische Apoptose“ fällt der Zelluntergang im Rahmen der Zellhomeostase. Im Gegensatz zur Apoptose steht der Zelluntergang durch Nekrose. Während die Apoptose genetisch kodiert ist, ist Nekrose ein unkontrollierter, passiver Prozess, der meist Gruppen von Zellen betrifft. Ausgelöst wird Nekrose durch zwei Hauptstimuli: Energiemangel der Zelle und direkte Schädigung der Zellmembran (Elmore, 2007). Charakteristische morphologische Veränderungen, die während der Nekrose auftreten, sind Zellschwellung und Karyolyse. Durch den Verlust einer intakten Zellmembran und den Austritt von Zellbestandteilen in die Umgebung werden chemotaktische Stoffe frei, die Makrophagen aktivieren und inflammatorische Prozesse einleiten.

Morphologisch unterscheidet sich die Apoptose zum nekrotischen Zelluntergang durch geordnete Zellveränderungen (Cohen, 1993). Dadurch kann der Vorgang der Apoptose in drei charakteristische Schritte eingeteilt werden (Arends et al., 1990). Im ersten Schritt kommt es zu einer Zellschrumpfung mit einer Verdichtung der Zellorganellen und Kernpyknose. Die Chromatinkondensation, die zur Pyknose führt, ist das Charakteristikum der Apoptose (Kerr et al., 1972). Darauf folgend kommt es zu Karyorrhexis und es bilden sich viele kleine membrangebundene apoptotische Körper, sogenannte „apoptotic bodies“, die Cytoplasma und Organellen enthalten. Die Integrität der Zellmembran bleibt während des „blebbing/budding“ erhalten. Die

apoptotic bodies werden nun im nächsten Schritt z.B. von Makrophagen oder Parenchymzellen phagozytiert und abgebaut. Da keine Zellbestandteile in die Umgebung abgegeben und apoptotische Zellen schnell abgebaut werden, geht dieser Prozess im Vergleich zum nekrotischen Zelluntergang ohne Entzündung einher (Savill & Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003).

Ein biochemisches Kennzeichen der Apoptose ist die Ausbildung einer charakteristischen „DNA-Leiter“, die auch durch Anfärben sichtbar gemacht werden kann. Diese entsteht durch die Spaltung der DNA von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonukleasen in 180-200 kbp große Fragmente (Bortner et al., 1995). Ein weiteres biochemisches Merkmal ist die Expression von Markern an der Zelloberfläche, die für eine schnelle Phagozytose sorgen. Dieses Signal entsteht durch die Verlagerung von Phosphatidylserin aus dem Inneren der Lipiddoppelschicht auf die äußere Seite der Zellmembran (Bratton et al., 1997).

### **1.3.2 Mechanismus der Apoptose**

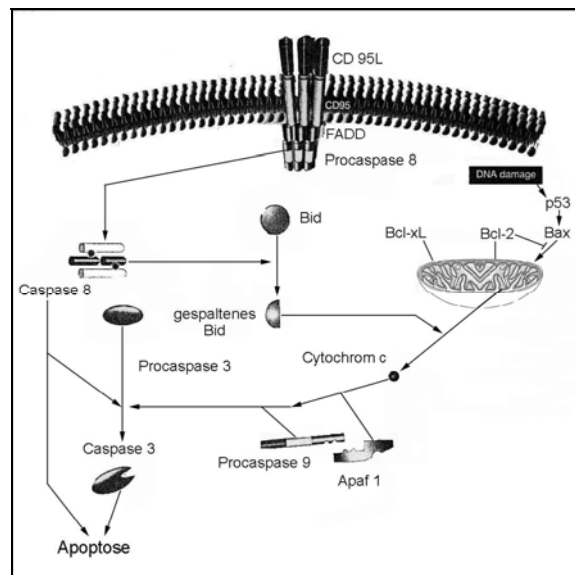
Eine wichtige Rolle in der komplexen Kaskade der Apoptose nehmen die Caspasen (cystein aspartyl proteasen) ein. Sie liegen inaktiv als Procaspasen vor und werden proteolytisch nach Induktion der Apoptose aktiviert. Dadurch sind sie in der Lage, weitere Procaspasen zu aktivieren. Die Caspasen, die maßgeblich in den Vorgang der Apoptose involviert sind, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Initiator-Caspasen (Caspasen 2, 8, 9, 10) und die Effektor-Caspasen (Caspasen 3, 6, 7) (Cohen, 1997; Rai et al., 2005). Die Effektor-Caspasen werden meist durch andere Caspasen aktiviert, während Initiator-Caspasen durch Protein-Protein Interaktionen aktiviert werden (Hengartner, 2000).

Der Apoptosemechanismus kann durch zwei alternative Signalwege initiiert werden: extrinsisch über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren (Rezeptor-Weg) und intrinsisch durch die Freisetzung apoptose-stimulierender Faktoren aus den Mitochondrien (mitochondrialer Weg).



Der extrinsische Pfad wird durch Transmembran-Rezeptoren aktiviert, die der Familie der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie (z.B. CD95) angehören (Locksley et al., 2001). Auf intrazellulärer Seite besitzen diese Rezeptoren eine Todesdomäne (death domain), die entscheidend ist für die Weiterleitung extrazellulärer Signale auf die intrazellulären Signalkaskaden (Ashkenazi & Dixit, 1998). Bindet der spezifische Ligand (z.B. TNF $\alpha$ , Fas-L, TRAIL) an den extrazellulären Rezeptor, lagert sich das Adapterprotein FADD an und es kommt zur Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Dieser assoziiert dann mit dem Enzym Procaspase-8 und aktiviert diese (Hengartner, 2000). Die aktive Caspase-8 spaltet dann die Caspasen 3 und 7, die die Apoptose ausführen (Krammer, 2000). Ist die Menge an aktivierter Caspase 8 zu gering, um die Effektorcaspasen direkt zu aktivieren, wird ein mitochondrialer Amplifikationsmechanismus benötigt. Das pro-apoptotische BH3-only Protein BID wird von der Caspase 8 gespalten und aktiviert. Die gespaltenen BID Proteine translozieren in das Mitochondrium und induzieren dort die Freisetzung apoptose-induzierender Faktoren (Igney & Krammer, 2002; Okada & Mak, 2004).

Der intrinsische Weg kann durch DNA-Schädigung und extrazelluläre Faktoren stimuliert werden. Es kommt zu einer Änderung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran und Cytochrom c wird freigesetzt. Cytochrom c bildet mit Apaf-1 und der inaktiven Initiatorcaspase Procaspase-9 einen Komplex, das „Apoptosom“ (Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004). Durch die Komplexbildung wird die Caspase 9 aktiviert und induziert über die Spaltung der Effektorcaspase 3 die Apoptose (Igney & Krammer, 2002; Kroemer et al., 1998).



**Abb. 1-2 Schema der wichtigsten Apoptosewege** (links: Rezeptor vermittelter Apoptoseweg; rechts: mitochondrialer Apoptoseweg, nach Hengartner, 2000)

Die Regulation der mitochondrialen Abläufe erfolgt durch die Mitglieder der Bcl-2 Familie (Cory & Adams, 2002). Lokalisiert sind diese entweder im Cytosol oder gebunden an die Mitochondrienmembran. Die Vertreter der Bcl-2 Familie sind entweder pro- oder anti-apoptotisch (Tab.1) und regulieren die Permeabilität der Mitochondrienmembran. Ihre Hauptfunktion ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium über Veränderungen der Membranpermeabilität (Elmore, 2007).

Durch die Bildung von Heterodimeren zwischen pro- und anti-apoptotischen Vertretern verschiebt sich das Gleichgewicht und die Apoptose kann eingeleitet werden. So kann Bid durch Bildung eines Heterodimers mit Bcl-xL oder Bcl-2 deren protektive Wirkung neutralisieren und den Zelltod initiieren (Yang et al., 1995). Wenn Bcl-2 und Bcl-xL nicht gebunden sind, verhindern sie die Freisetzung von Cytochrom c und somit die Apoptose.

<b>Pro-apoptotische Wirkung</b>	<b>Anti-apoptotische Wirkung</b>
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-xl
Bid	Bcl-XS
Bad	Bcl-w
Bim	Bcl-x

**Tab.1:** Diese Tabelle zeigt einige Mitglieder der Bcl-2 Familie.

Eine wichtige Rolle scheint Apoptose bei der Skelettentwicklung zu spielen. Während der chondralen Ossifikation kommt es erst zur Proliferation der Chondrozyten mit anschließender Differenzierung in mature Chondrozyten. In der Phase der Mineralisierung und Gefäßeinsprossung kommt es zum Zelltod der Chondrozyten. Amling et al. konnten 1997 zeigen, dass PTHrP bei der Regulation der Apoptose in Chondrozyten eine wichtige Rolle spielt. In Chondrozyten führt PTHrP zu einer Steigerung der cAMP und der Bcl-2 Konzentration und liegt somit oberhalb im Signalweg. In transgenen Mäusen, die PTHrP überexprimieren, kommt es zu einer gestörten Skelettentwicklung. Phenotypisch weisen diese Knockout-Mäuse verkürzte Gliedmaßen auf, bedingt durch eine gestörte Reifung der Chondrozyten, ähnlich wie bei der beim Menschen auftretenden Jansen's Metaphysären Chondrodysplasie.

Die Bedeutung der Apoptose im Rahmen degenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer und Morbus Parkinson, wird diskutiert. Das veränderte Protein A $\beta$  kann extrazellulär angelagert über den Rezeptorweg Caspasen aktivieren. Intrazellulär kann A $\beta$  sich im endoplasmatischen Retikulum oder in Endosomen anlagern und über den mitochondrialen Weg Apoptose auslösen. Die Effekte von anderen Schäden, wie oxidativer Stress, Sauerstoff bzw. Glucose-Entzug können durch A $\beta$  verstärkt werden. Wird die Apoptose ausgelöst und Caspasen aktiviert, spalten die Caspasen das Protein tau und es kommt zur Ausbildung von neurofibrillären tangles (Götz, 2007).

## 1.4 Aufgabenstellung

Die Stimulation endothelial exprimierter  $\alpha 7$ -nikotinerger Rezeptoren wird seit einiger Zeit in der Therapie der Alzheimer Erkrankung diskutiert, da so ein Fortschreiten der auftretenden Gefäßrarefizierung verhindert werden soll (Rosengarten et al., 2006).

Eine Studie, die 2007 von Meurrens et al. durchgeführt wurde, untersuchte die Folgen des Rauchens auf das Fortschreiten der myokardialen Hypertrophie. Spontan hypertensive Ratten wurden über einen bestimmten Zeitraum, entweder 30 oder 90 Tage, standardisiertem Zigarettenrauch ausgesetzt. Diese Ratten zeigten anschließend eine Zunahme des Herzgewichts und eine Expressionssteigerung der Proteine ANF (atrialer natriuretischer Faktor), TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und PTHrP. Nikotin führte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu einer Steigerung der PTHrP-Expression (Ruf, 2007).

PTHrP, endogen freigesetzt, hat am Herzen als parakriner Faktor eine wichtige Bedeutung, sowohl in der Regulation des koronaren Blutflusses als auch im Rahmen der postischämischen Erholung. Außerdem spielt PTHrP auch eine Rolle in der Apoptoseresistenz von Endothelzellen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die These, dass auch am Herzen durch Nikotin ein protektiver Effekt erzielt werden kann. Es wurde mit koronaren mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte gearbeitet und untersucht, ob auch an Herzgefäßen durch eine nikotinerge Rezeptorstimulation über einen ähnliche Mechanismus, wie am Alzheimer erkrankten Gehirn, einer Gefäßrarefizierung entgegen gewirkt und ein anti-apoptotischer Effekt erzielt werden kann.

Folgende detaillierte Fragestellungen wurden untersucht:

- 1) Kann durch Nikotin über eine Aktivierung der nikotinerger Rezeptoren die PTHrP-Expression in koronaren mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte gesteigert werden?
- 2) Welche Rezeptortypen des nikotinerger AChR werden in isolierten koronaren Endothelzellen exprimiert?

- 3) Wie erfolgt die Signaltransduktion bei einer nAChR-Aktivierung; welche MAP-Kinasen sind involviert?
- 4) Kann durch eine Nikotinstimulation die Apoptoseresistenz in Endothelzellen gesteigert werden?

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Häufig verwendete Chemikalien

<u>Name:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
APS	Merck, Darmstadt
Basenpaar (100bp) DNA-Marker	New England Biolabs, Frankfurt
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Benzonase <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
$\alpha$ -Bungarotoxin	Sigma, Taufkirchen
Carbogen <sup>®</sup>	AirLiquide
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase; Typ CLSII	Biochrom, Berlin
Desoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Diethylaether	Roth, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe

## Material

---

EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
First Strand Puffer	Invitrogen; Karlsruhe
Fungizone	Invitrogen; Karlsruhe
Gentamycin	Invitrogen; Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Mecamylamin	Sigma, Taufkirchen
Molekulargewichtsmarker	Amersham, Freiburg (New England Biolabs, Frankfurt)
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt

---

NBT	AppliChem, Darmstadt
NCS	Invitrogen, Karlsruhe
Nikotin	Sigma, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PD98059	Calbiochem, Schwalbach
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylephrine	Calbiochem, Schwalbach
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Proteinmarker	New England Biolabs, Frankfurt
SDS	Serva, Heidelberg
SB202190	Calbiochem, Schwalbach
SP600125	Calbiochem, Schwalbach
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Taufkirchen
TGF- $\beta_1$	Calbiochem, Schwalbach
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Trizol-Reagenz	Sigma, Taufkirchen



W-1 [1%]

Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Schwalbach) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien sind nach Herstellerangaben aufbewahrt und gelöst.

### 2.1.2 Chemikalien für den Apoptose-Assay

Hoe 33258

Riedel de Haen, Seelze

Propidiumjodid

Sigma, Taufkirchen

### 2.1.3 Chemikalien für RT-PCR und real-time PCR

DNase

Qiagen, Hilden

10xDNase-Puffer

Qiagen, Hilden

d-NTPs

Invitrogen, Karlsruhe

iQ-SYBR<sup>®</sup>green-Supermix

Bio-Rad, München

MgCl<sub>2</sub>

Invitrogen, Karlsruhe

M-MLV-RT

Invitrogen, Karlsruhe

Oligo dT<sub>(15)</sub>

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

PCR-Puffer (5xRT-Puffer, 10xPCR-Puffer)

Invitrogen, Karlsruhe

RNAasin

Promega, Mannheim

SYBRsafe<sup>®</sup>

Invitrogen, Karlsruhe

Taq-DNA-Polymerase

Invitrogen, Karlsruhe

---

### 2.1.4 Primer für RT-PCR und real-time PCR

Bax-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Bcl-2-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
HPRT-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
nAChR-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
PTHrP-Rezeptor-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
TGF $\beta$	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.5 Antikörper für Immunoblots

anti Actin	Sigma, Taufkirchen
anti p42-MAP-Kinase	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti p42p-MAP-Kinase	Cellsignaling, Frankfurt a.M.
anti p38-MAP-Kinase	Calbiochem, Schwalbach
anti p38-MAP-Kinase	Sigma, Taufkirchen
anti p38p-MAP-Kinase	Sigma, Taufkirchen
anti JNK1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti pJNK	Cellsignaling, Frankfurt a.M.
anti Bcl-2	Becton Dickinson, Heidelberg
anti PTHrP	Calbiochem, Schwalbach
anti PTH/PTHrP-Rezeptor	Upstate biotechnology, Millipore, Eschborn
anti mouse IgG	Sigma, Taufkirchen
anti rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen
anti goat&rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen

## **2.2 Geräte und Laborbedarf**

### **2.2.1 Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände**

#### **2.2.1.1 Zellkultur**

Bauchdeckenschere (gebogen, 160 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere groß (170 mm)	Aesculap, Tuttlingen
Präparierschere klein	Aesculap, Tuttlingen
Kapselpinzette	Eickemeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Universität Gießen
Tissue Chopper HSE	March-Hugstetten
Nylonnetz (Polyamid, 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge (Megafuge 2.0)	Kendro, Hanau
Sterilbank (Typ: Lamin Air® HBB 2472)	Kendro, Hanau
Brutschrank (Typ: Cytoperm)	Kendro, Hanau
Mikroskop TMS-F	Nikon, Japan
50 ml Röhrchen Typ: Falcon 2070	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen Typ: Falcon 3001, 3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber Typ Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg

#### **2.2.1.2 RT-PCR und Real-time PCR**

iCycler	BioRad, München
Thermo Cycler	Techne, Minneapolis, USA
NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektral- photometer	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

---

0,2 ml Thermo-strip	Thermo ScientificABgene <sup>®</sup> , Hamburg
---------------------	--

### **2.2.1.3 Western blot**

Glasplatten	GE Healthcare (Amersham), Freiburg
Spacer	GE Healthcare (Amersham), Freiburg
Profilformer	GE Healthcare (Amersham), Freiburg
Elektrophoresekammer	GE Healthcare (Amersham), Freiburg
Blotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Immobilon P (PVDF-Membran)	Millipore, Eschborn
Netzgerät	Biometra, Göttingen
Dot blot MINIFOLD-Kammer	Schleicher & Schuell, Dassel

### **2.2.1.4 Apoptose-Assay**

Fluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence, Neu-Isenburg
------------------------------	-----------------------

### **2.2.2 Sonstige Geräte**

Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Glaswaren	Schott, Mainz
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnetheizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen

Mischer/Schüttler	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Thermoblock Dri-Block <sup>®</sup> DB.2D	Techne AG, Erlangen
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau
Vortexer	Heidolph, Kelheim

### 2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

### 2.2.4 Software

Image Quant	Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft Excel	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows ME	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word	Microsoft Corp., USA

### 3 Methoden

#### 3.1 Isolierung von koronaren Endothelzellen

##### 3.1.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung mikrovaskulärer Endothelzellen wurden adulte männliche Wistar Ratten mit 200-300g Lebendgewicht verwendet. Die Ratten stammten aus der haus-eigenen Zucht des Tierstalls des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universi-tät Gießen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Teklad Global 2018 der Firma Harlan Teklad).

##### 3.1.2 Präparation von mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Rattenherz

Die Präparation der Ratten, der Endothelzellen und der Kardiomyozyten erfolgte nach der Methode von Schlüter und Schreiber (Schlüter und Schreiber, 2005).

Das hierfür verwendete Langendorff-Perfusionssystem wurde vor Beginn mit aqua bidest. und Perfusionsmedium gespült. Anschließend wurde die Anlage luftblasenfrei mit Perfusionsmedium gefüllt und kontinuierlich mit Carbogen begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Das Perfusionsmedium wurde in der Perfusionsanlage konstant auf 37° Celsius gehalten.

Powell-Medium: (kontinuierlich mit Carbogen begast)

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,0 mM
Glukose	11,0 mM

Die Ratten wurden 1-2 Minuten mit Diäthyläther narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach Thorakotomie wurde das Herz mit der Lunge vorsichtig entnommen und sofort in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung verbracht. Nun wurden Blut und Gewebereste entfernt, die Lunge an den Hauptbronchien abgetrennt und anschließend Ösophagus und Trachea abpräpariert.

Die Aorta wurde möglichst weit distal mit der Pinzette gefasst und hinter der ersten abzweigenden Arterie separiert. Dann wurde das Herz mit der Aorta ascendens an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur angeschlossen. Mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro Sekunde wurde das Herz mit ca. 40 ml Perfusionsmedium gespült, um Blutleere zu erreichen. Darauf folgte die retrograde, rezirkulierende Perfusion mit 50 ml Kollagenasepuffer (s. u.) für 25 Minuten. Über eine Pumpe wurde eine Flussrate von 5 ml/min/Herz eingestellt.

### Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	50,0 ml
Kollagenase	x mg (chargenabhängig)
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

### Kalziumstammlösung:

CaCl <sub>2</sub>	100 mmol/l
-------------------	------------

Nach der Reperfusion wurde das Herz von den Vorhöfen, Bindegewebe und den großen Gefäßen getrennt und in ca. 5 mm große Stücke zerkleinert. Eine weitere mechanische Zerkleinerung erfolgte mit einem Gewebehacker (Schnittstärkeneinstellung: 0,7mm) in zwei Ebenen. Daran schloss sich ein enzymatischer Nachverdau des Gewebehomogenats in einem Teflongefäß mit 30 ml, 37°C warmem Kollagenasepuffer an. Während des zehnminütigen Verdaus wurde das Homogenat ständig mit Carbogen begast. Um den Erfolg der Zellseparierung zu erhöhen, wurde mehrmals mit einer Pipette das Homogenat durchmischt.

Nach Beendigung des Nachverdaus wurde die Zellsuspension mit einer Nylongaze (Porengröße 200µm) filtriert und dann bei ca. 25 x g 3 Minuten zentrifugiert, um die intakten Zellen von Zelltrümmern und der Kollagenaselösung zu separieren.

Der endothelzellhaltige Überstand des Zentrifugats wurde mit 10 mg Trypsin und 30 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung vermischt und für 30 min bei 37°C unter konstanter Carbogen-begasung durch elektrisches Rühren suspendiert, um die Zellverbände aufzulösen. Die erhaltene Zellsuspension wurde nach erfolgter Inkubation in zwei sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt und jeweils in 30 ml M199/CO<sub>2</sub> (37°C) aufgenommen.

M199/CO<sub>2</sub> (sterilfiltriert):

Medium 199/Earl's Salts	9,5 g
HEPES	15,0 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	17,9 mmol/l
Aqua bidest.	ad 1,0 l

auf pH 7,4 eingestellt

Nun wurde alles bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 10 ml des auf 37°C vorgewärmten Endothelzellmediums resuspendiert.

Endothelzellmedium:

M199/CO <sub>2</sub>	x ml
NCS/FCS (1:1)	20 % (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Die Zellsuspension wurde unter der Sterilbank in 20 ml Medium auf einer Primaria-schale<sup>®</sup> Falcon Typ 3803 ausplattiert und für vier Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Endothelzellmedium gewaschen, um nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Die Zellen bekamen alle zwei Tage



frisches Medium zugeführt, bis sich ein konfluenten Zellrasen ausgebildet hatte. Die Antibiotikakonzentration wurde von anfänglich 5% auf 2% reduziert.

### 3.1.3 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen

Nach 5-6 Tagen hatte sich ein konfluenten Zellrasen ausgebildet und die Zellen konnten weiter verwendet werden. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen zweimal mit 30 ml EDTA-Puffer gewaschen.

EDTA ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildner, der freies  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Medium binden soll, um eine Inhibierung des Trypsins durch Kalzium auszuschließen.

<u>EDTA-Puffer:</u>	5 l
NaCl	36,55 g
KCl	0,98 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,83 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,45 g
HEPES	11,90 g
EDTA- $\text{Na}_2$	0,93 g

Auf pH 7,4 eingestellt und steril filtriert

Nach dem Absaugen des EDTA-Puffers erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin für ca. 10 Minuten bei 37°C ohne  $\text{CO}_2$ -Begasung, um die Zellen von der Kulturschale und voneinander zu lösen. Anschließend wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion durch Überführen in Endothelzellmedium abgestoppt.

Je nach Versuchsansatz wurde eine festgelegte Zellzahl benötigt, mittels der Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt. Es wurden 10 µl des zellhaltigen Endothelzellmediums in die Zählkammer gefüllt und 4 Großquadrate ausgezählt. Die vorhandene Zellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

---

$$\frac{\text{Summe der Zellen}}{4} \times 10.000 = \text{Zellzahl proml}$$

Um die gewünschte Zellzahl zu errechnen, bediente man sich folgender Formel:

$$\frac{\text{Gewünschte Zellzahl pro Kulturschale}}{\text{Zellzahl proml}} = x \text{ ml}$$

Nun wurden die Zellen auf die je nach Versuchsansatz benötigte Anzahl Kulturschalen (Falcon Typ 3001) ausplattiert. Je nach Wachstumsrate dauerte es ein bis zwei Tage, bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte und die Zellen für den Versuch zur Verfügung standen.

## 3.2 Zellinduktion

Die Endothelzellen wurden je nach Versuchsprotokoll mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Ein Teil der Schalen blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Folgende Substanzen wurden verwendet: Nikotin in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM Endkonzentration auf der Schale), die Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 (SB202190), p42 (PD98059), JNK (SP600125), und die unspezifischen und spezifischen Inhibitoren der nACh-Rezeptoren Mecamylamin und α-Bungarotoxin.

## 3.3 Zellernte

### 3.3.1 Zellernte für den Western-Blot

Nach Entfernen des Endothelzellmediums wurden die Zellen mit 1 ml 4°C kalter PBS-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubationsphase mit 100 µl Lysispuffer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur, um die Zellmembranen aufzulösen.

Um die Nukleinsäuren zu lysieren wurden anschließend 10 µl Benzonase® [50 U/ml] zugegeben und für weitere 10 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die gelösten und

noch anhaftenden Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und mit dem Lysispuffer in ein Reaktionsgefäß verbracht.

### Lysispuffer:

TRIS/HCL	50 mmol (pH 6,7)
SDS (10%)	2%
Na-O-Vanadat	1%
β-Mercaptopropandiol	2%
β-Glycerophosphat	40 mmol

Nach Zugabe von 20 µl Auftragspuffer (10% Glycerol, 90% H<sub>2</sub>O und Bromphenolblau) wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung der Proteinstruktur für 5 Minuten bei 95°C im Wärmeblock erhitzt. Anschließend wurden die Proben weiterverarbeitet oder bei -20° aufbewahrt.

### **3.3.2 Zellernte für PCR und RT-PCR**

Die Zellen, aus denen später RNA isoliert werden sollte, wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml PBS aufgenommen und wie folgt zentrifugiert: 3500 x g für 5 Minuten. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das gewonnene Zellpellet später zur RNA-Isolierung verwendet.

### **3.4 RNA-Isolierung aus Endothelzellen für PCR und RT-PCR**

Das nach der Zellernte erhaltene Pellet wurde mit 1 ml Trizol überschichtet und durch mischen gelöst. Durch das Trizol wurden RNAsen inhibiert und die Proteine denaturiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Chloroform zugegeben, um die einzelnen Phasen zu trennen. Nach dem Durchmischen wurde bei 4°C und 15000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden ca. 450 µl des RNA-haltigen Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 450 µl Isopropanol versetzt.

Das restliche Homogenat, das in der unteren Schicht DNA und in der mittleren Schicht Proteine enthielt, wurde verworfen.

Die 20minütige Fällung der RNA mit Isopropanol erfolgte bei -20°C. Die RNA wurde anschließend nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 15000 x g für 15 Minuten durch dekantieren gewonnen. Das RNA-Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert und gewaschen. Nach weiterer Zentrifugation wurde das Ethanol dekantiert und das Pellet für 20 Minuten getrocknet. Eine Resuspension des Pellet erfolgte mit 10 µl DEPC-Wasser. Dann wurde die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Alle Arbeitsschritte der RNA-Isolierung erfolgten auf Eis, um vorhandene RNAsen zu inhibieren.

### 3.5 DNA-Behandlung

Die DNA-Behandlung schloss sich der RNA-Isolierung an. Sie diente dazu, Nukleinsäuren von Proteinen zu reinigen. Mit Hilfe eines Phenol/Chloroform Gemisches wurde durch Zentrifugation eine Phasentrennung erreicht.

Zu 10 µl isolierter RNA wurden 40 µl DNase-Mix gegeben und für 1,5 Stunden bei 37°C erhitzt.

<u>DNase-Mix</u>	(1fach)
10x DNase Puffer (10x PCR-MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	5 µl
DTT (0,1 M)	5 µl
DNase	1 µl
RNAsin	1 µl
DEPC	23 µl

Anschließend wurde kurz abzentrifugiert und 450 µl DEPC-Wasser zugeben. Nun wurde ein Volumenanteil Phenol/Chloroform (1/1, v/v) mit einem Volumenanteil DNA-

Lösung gemischt und bei 13000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erhielt man drei Phasen: die DNA verblieb in der oberen hydrophilen Phase, die Proteine lagerten sich in der mittleren Phase an und die untere lipophile Phase bildet das Phenol/Chloroform. Die wässrige DNAhaltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um Phenol-Reste zu entfernen, wurde der Vorgang mit Chloroform im Verhältnis 1:1 wiederholt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 x g und 4°C für 10 Minuten wurde der gewonnene Überstand zur Fällung der DNA in ein neues Reaktionsgefäß mit 550 µl Isopropanol (im Verhältnis 1:1) und 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Lösung überführt. Es wurde gut durchmischt und für 30 Minuten bei 4°C bei 13000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Homogenates verworfen und die DNA mit 500 µl Ethanol (70%, v/v) gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert und nach entfernen des Ethanols das Pellet für 30 Minuten getrocknet. Die Resuspension erfolgt in 10 µl DEPC-Wasser.

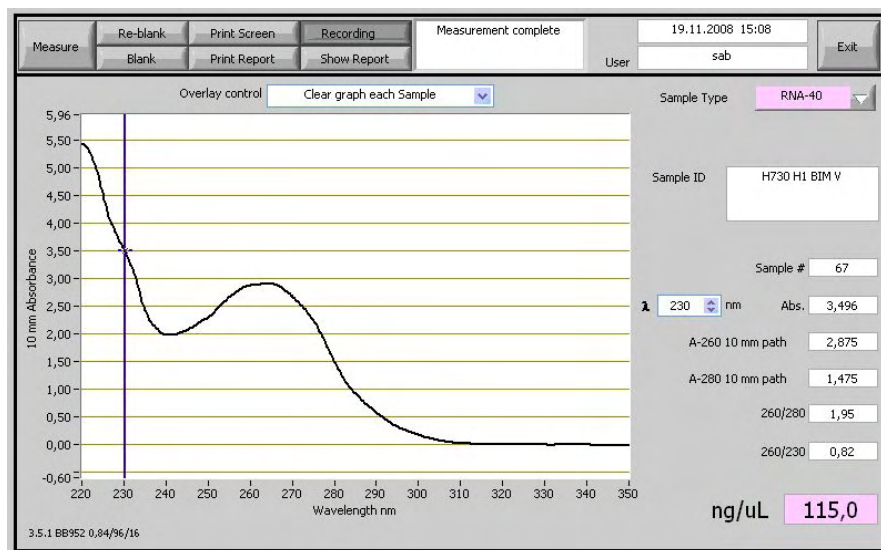
### 3.6 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer. Das Gerät führt Messungen im Wellenlängenbereich von 120-750 nm durch. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein Probenvolumen von 1,5 µl benötigt. Vor Beginn der Messung wurde das Gerät mit aqua bidest. kalibriert. Dann wurde das Probenvolumen auf den Sensor aufgetragen und die Messung gestartet.

Das Nano-Drop-Gerät errechnet die RNA-Konzentration in ng/µl (Abb. 3-1). Da 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben werden sollte, wurde mit folgender Formel das Probenvolumen bestimmt:

$$\frac{\text{Konzentration der RNA}}{1000} = x \mu l$$

Um ein Volumen von 5 µl für die Reverse Transkription zu erhalten, wurden x µl der vorliegenden Probe mit aqua bidest. bis auf 5 µl Volumen aufgefüllt.



**Abb. 3-1 RNA-Messkurve des Nano Drop Gerätes**

### 3.7 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der Reversen Transkription wurde mRNA als Matrize zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Es wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben. Das eingesetzte Volumen betrug 5 µl.

Die Probensuspension wurde bei 60°C für 15 Minuten im Thermocycler denaturiert. In dieser Zeit wurde der Reaktionsmix hergestellt.

#### Reaktionsmix je Probe:

5x RT-Puffer	2,0 µl
Oligo-dT	1,0 µl (0,1 mg/ml)
dNTP`s	1,0 µl (10 mmol/l je Nukleotid)
DTT	0,5 µl (0,1 mol/l)
RNAsin	0,2 µl (25 U/µl)
M-MLV-RT	0,3 µl (200 U/µl)

Anschließend wurden die Proben auf Eis verbracht und 5 µl Reaktionsmix zugegeben.

Die Reverse Transkription erfolgte bei 37°C für eine Stunde im Thermocycler. Anschließend wurde die gewonnene cDNA für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und konnte direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

### **3.8 RT-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) und Real-time PCR**

#### **3.8.1 Einführung in die Methode**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde von Kary Mullis (Mullis et al., 1986) entwickelt. Diese Methode ermöglicht es, mit Hilfe der DNA-Polymerase einen gewünschten DNA-Abschnitt exponentiell zu amplifizieren. Dazu benötigt werden die Template-DNA, eine hitzestabile Polymerase, Primer als Startsequenz für die Polymerase und die einzelnen Nukleotide als Bausteine für die neusynthetisierte DNA. Wenn RNA als Ausgangsprodukt vorliegt, muss zuerst mittels der reversen Transkription die RNA in cDNA umgeschrieben werden (RT-PCR).

Das Prinzip der PCR basiert auf einem sich wiederholenden Zyklus, bestehend aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Als erstes wird durch das Erhitzen auf 95°C die Denaturierung der komplementären DNA-Stränge erreicht. Nun wird die Temperatur auf die individuelle Annealingtemperatur gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA kommt. Durch das erneute Erhitzen auf 72°C wird enzymatisch durch die DNA-Polymerase der Primer weiter verlängert, bis er ein genaues Duplikat der ursprünglichen DNA darstellt.

Die Syntheserate verläuft nach einem exponentiellen Wachstum, so dass es nach jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der Produktmenge kommt. Ab einer gewissen Produktmenge und Zyklenzahl kommt es zu einer Verlangsamung der Reaktion und einem Plateau-Effekt.

### 3.8.1.1 RT-PCR: Durchführung der Methode

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt, die verwendeten Reaktionsgefäße wurden zuvor UV bestrahlt.

Als Template diente die unter 3.4.3 gewonnene cDNA.  $\beta$ -Actin wurde als Funktionskontrolle für die cDNA verwendet. Der Reaktionsmix ohne Probe diente als Laufkontrolle. Je Probe wurden 1,5  $\mu$ l unverdünnte cDNA und 8,5  $\mu$ l des PCR-Reaktionsmix zugegeben. Jede Probe wurde im Doppelansatz eingesetzt.

#### PCR-Reaktionsmix:

10x PCR-Puffer	1,0 $\mu$ l
a.dest	5,8 $\mu$ l
Primergemisch (for&rev) (100mmolar)	0,3 $\mu$ l
dNTP's (10 mmolar)	0,4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mmolar)	0,3 $\mu$ l
1% W1	0,5 $\mu$ l
Taq-Polymerase	0,2 $\mu$ l

Die Mg<sup>2+</sup>-Ionen sind für die Funktion der Polymerase essentiell.

### 3.8.1.2 Verwendete Primer

		Annealingtemperatur:	
nAChR $\alpha$ 2	CTT CGG TGA AGG AAG ACT GG	(fw-Primer)	59°C
	GGA GCC AAC ATG AAG GAC AT	(rev-Primer)	
nAChR $\alpha$ 3	CGC CTG TTC CAG TAC CTG TT	(fw-Primer)	59°C
	CTT CAG CCA CAG GTT GGT TT	(rev-Primer)	
nAChR $\alpha$ 4	GAC TTT GCA GTC ACC CAC CT	(fw-Primer)	59°C
	CGG CTA TGC ATG CTC ACT AA	(rev-Primer)	
nAChR $\alpha$ 5	ACC CTA CCA ATT TGC AAC CA	(fw-Primer)	57°C
	GAC CCA AAG ACC CAT TCT GA	(rev-Primer)	



nAChR $\alpha 6$	TGG TGT TAA GGA CCC CAA AA GCT GCT GGC TTA ACC TCT TG	(fw-Primer) (rev-Primer)	59°C
nAChR $\alpha 7$	ACC CTC CAT AGG ACC AGG AC GGA GGC TGT ACA AGG AGC TG	(fw-Primer) (rev-Primer)	59°C
nAChR $\alpha 9$	CGT GGG ATC GAG ACC AGT AT TCA TAT CGC AGC ACC ACA TT	(fw-Primer) (rev-Primer)	57°C
nAChR $\alpha 10$	TCT GAC CTC ACA ACC CAC AA TCC TGT CTC AGC CTC CAT GT	(fw-Primer) (rev-Primer)	57°C

(Lips et al., 2005)

### 3.8.1.3 PCR-Laufprogramme

Die PCR wurde mit einem Thermocycler unter unten angegebenen Konditionen durchgeführt.

Zyklus 1: (1x)

94°C für 5 Minuten

Zyklus 2: (40x)

94°C für 45 sek (Denaturierung)

x°C für 45 sek (Annealing)

72°C für 45 sek (Amplifikation)

Zyklus 3: (1x)

72°C für 7 Minuten

Die Annealingtemperatur wurde spezifisch für jeden Primer eingestellt.

### 3.8.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese. Dafür wurden die PCR-Amplifikate nach Zugabe von 1 µl Ladepuffer auf ein natives zwei-prozentiges Agarosegel aufgetragen und in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer aufgetrennt.

#### Agarosegel 2 %

1,5 g Agarose

75,0 ml 1xTAE-Puffer

3,8 µl SYBRsafe®

Die Agarose wurde mit TAE-Puffer mittels aufkochen in der Mikrowelle gelöst, bis eine klare homogene Lösung entstand. Anschließend wurde SYBRsafe® zugegeben und die Gellösung in die Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach Einsetzen der Profilformer erfolgte eine ca. 1,5 Stunden lange Polymerisationszeit. Dann wurde die Kammer mit TAE-Puffer befüllt und 10 µl der Proben aufgetragen. Um die Fragmentgröße der Proben bestimmen zu können, wurde ein DNA-Längenmarker verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 75 Volt für ca. 30 Minuten. Anschließend konnte das Ergebnis der PCR unter UV-Beleuchtung betrachtet und fotografisch festgehalten werden. Die Fluoreszenzmaxima des verwendeten Farbstoffes SYBRsafe® liegen bei 280 und 502 nm.

#### Ladepuffer

10xTAE-Puffer	x ml
Saccharose	50 % (wt/vol)
Bromphenolblau	1 % (wt/vol)
Xylencyanol	1 % (wt/vol)

#### 10xTAE-Puffer

Tris-Acetat	40 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

### 3.8.2 Real-Time PCR

Mit der Weiterentwicklung der real-time PCR durch Higuchi (Higuchi et al. 1993) wurde es möglich, mittels Messung von Fluoreszenzsignalen quantitativ DNA-Mengen zu bestimmen. Die Intensität des Fluoreszenzsignales ist direkt proportional zu der Menge der gebildeten Produkte. Gemessen wird das Fluoreszenzsignal jeweils einmal pro Zyklus, nämlich immer am Ende der Extensionsphase. Zu diesem Zeitpunkt haben die meisten SYBR<sup>®</sup>green-Moleküle an die amplifizierte doppelsträngige DNA gebunden und das Fluoreszenzsignal ist somit am höchsten. SYBR<sup>®</sup>green ist ein cyclischer Cyaninfarbstoff, der eine 100fach höhere Affinität zu DNA hat als Ethidiumbromid und weniger mutagen ist. SYBR<sup>®</sup>green fluoresziert, wenn er in doppelsträngige DNA eingebaut wird. Allerdings geschieht die Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA sequenzunspezifisch. Aus diesem Grund ist es notwendig, mittels einer Schmelzkurve zwischen dem gewünschten Produkt und unspezifisch entstandenen Produkten zu unterscheiden. Die amplifizierten Produkte denaturieren bei einer bestimmten Temperatur (Schmelztemperatur) und setzen mit einem Mal den gesamten Fluoreszenzfarbstoff frei. Dadurch kommt es zu einem starken Abfall des Fluoreszenzsignals. Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Produktlänge, so dass man Primerdimere und unspezifische Produkte gut von dem spezifischen Produkt abgrenzen kann.

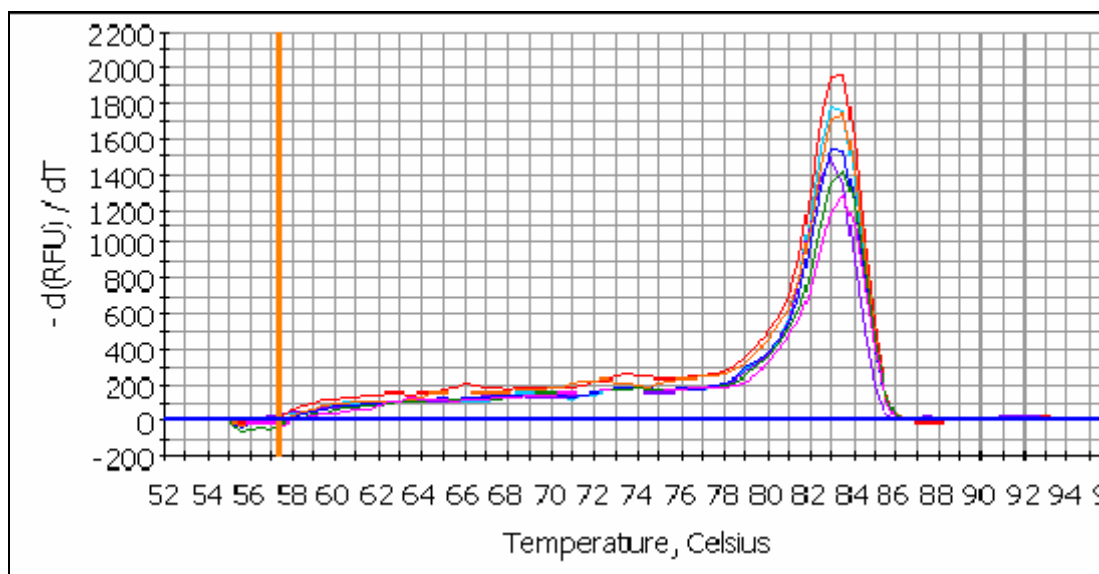


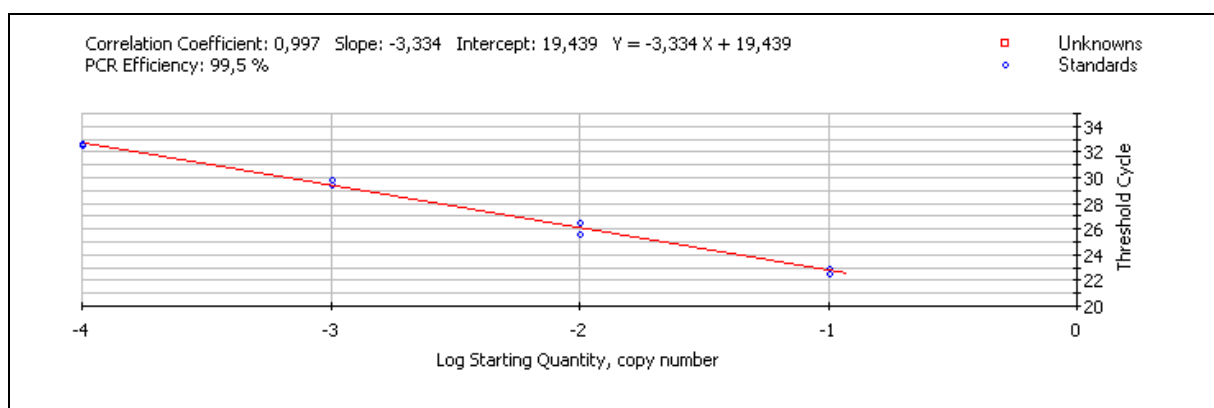
Abb. 3-2 Schmelzkurve ohne Primerdimere

### 3.8.2.1 Verwendete Primer real-time PCR

Folgende Primer wurden in der real-time PCR verwendet:

HPRT	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	(fw-Primer)
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	(rev-Primer)
(Ross et al.,2005)		
Bax	CCT GAG CTG ACC TTG GAG CA	(fw-Primer)
	CCT GGT CTT GGA TCC AGA CA	(rew-Primer)
PTHrP-R	GGC TGC ACT GCA CGC GCA A	(fw-Primer)
	TTG CGC TTG AAG TCC AAC GC	(rew-Primer)
Bcl-2	TTC TTT CCC CGG AAG GAT GG	(fw-Primer)
	GTC TGC TGA CCT CAC TTG TG	(rew-Primer)

Die verwendeten Primer wurden vor ihrem Einsatz optimiert. Über einen Temperaturgradienten wurde die optimale Annealingtemperatur ermittelt. Außerdem wurde überprüft, ob von einer Verdopplung beziehungsweise einer exponentiellen Amplifikation der DNA nach jedem Zyklus ausgegangen werden konnte. Dies ist für die spätere Auswertung von Bedeutung. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Template-DNA erstellt (1:10 bis 1:10000). Nur dann, wenn ein exponentieller Anstieg der Amplifikate zu Grunde liegt, weist die Standardkurve eine Steigung von -3,3 auf.



**Abb. 3-3** Diese Abbildung zeigt eine Standardkurve mit einer Steigung um -3,3, einen Korrelationskoeffizienten von 0,997 und eine Effizienz von ca. 100 %

### 3.8.2.2 PCR-Ansatz

Für die real-time PCR wurde die unter 3.4.3 gewonnene cDNA, sowie die benutzten Primer 1:10 verdünnt. Es wurden jeweils 3 µl DNA und 17 µl Reaktionsmix eingesetzt. Hier wurde der iQ-SYBR<sup>®</sup>green-Supermix verwendet.

#### real-time PCR Ansatz

iQ-SYBR <sup>®</sup> green-Supermix	10,0 µl
Primergemisch (for und rev)	0,6 µl
Aqua bidest.	6,4 µl
cDNA	3,0 µl

### 3.8.2.3 Laufprogramme der real-time PCR:

Bei der Programmierung des Icyclers wurde die spezifische Annealingtemperatur des jeweilig verwendeten Primers berücksichtigt.

Zyklus 1: (1x)

95°C für 3 Minuten

Zyklus 2: (45x)

95°C für 30 sek (Denaturierung)

x°C für 30 sek (Annealing)

72°C für 30 sek (Amplifikation)

Zyklus 3: (100x)

50°C-100°C je 10 sek (Schmelzkurve)

Annealingtemperaturen:

HPRT	63°C
Bcl 2	56°C
Bcl xl	65°C
Bax	58°C
PTHrP-Rezeptor	57°C

Die Zyklenzahl wurde für die einzelnen Primer nicht verändert. Mit Hilfe eines Schmelzvorganges konnten eventuelle Primer-Dimere und unspezifische Produkte identifiziert werden.

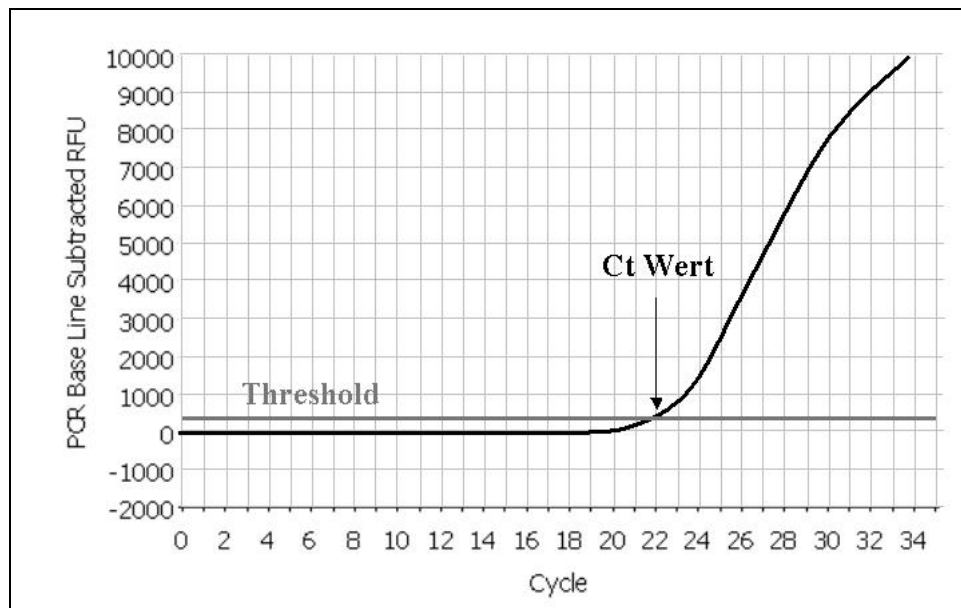
### 3.8.3 Auswertung der PCR

Die Auswertung der real-time PCR erfolgte als relative Quantifizierung nach der Methode von Pfaffl et al. (2001). Diese vergleicht die relative Expression eines Genes mit einem Referenzgen (Housekeeping Gen).

Zu Beginn der Reaktion sind noch nicht genügend Produkte vorhanden und das Fluoreszenzsignal kann noch nicht vom Hintergrund unterschieden werden. Der Schwellenwert (Threshold), ab dem das Fluoreszenzsignal gemessen werden kann, wird noch nicht überschritten. Die DNA-Konzentration steigt exponentiell an und nach einigen Amplifikationsschritten kann das entstehende Fluoreszenzsignal detektiert werden. Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, an dem die exponentielle Kurve den Threshold schneidet (siehe Abb. 3-3).

Der „Threshold“ wird über die iCycler-Software ermittelt: zuerst wird die Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen den Zyklen 2 bis 10, in denen die Kurve noch keinen signifikanten Anstieg durch die Amplifikation erfährt, ermittelt. Dann wird der Mittelwert aller Standardabweichungen der einzelnen Proben mit 10 multipliziert. Der erhaltene Wert wird als „Threshold“ festgelegt.

Der Ct-Wert verhält sich zur DNA-Menge umgekehrt proportional. Je kleiner der Ct-Wert ist, desto mehr DNA war zu Beginn der Reaktion vorhanden.



**Abb. 3-4 Die Abbildung zeigt, wie der Ct-Wert ermittelt wird.**

Um genauere quantitative Informationen zu erhalten, wurden die Amplifikate in Beziehung zu einem Housekeeping-Gen gesetzt. Das Housekeeping-Gen wird nicht mitreguliert, so dass man von einer gleichen Menge des Gens in allen Endothelzellen ausgeht. Hier wurde die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als Housekeeping-Gen verwendet.

Der Ct-Wert des Housekeeping-Gens HPRT jeder Probe wurde von dem Ct-Wert der jeweiligen Probe subtrahiert.

$$CT A_{Bcl2} - CT A_{HPRT} = \Delta CT A$$

A=Kontrolle, B=Stimuliert

$$CT B_{Bcl2} - CT B_{HPRT} = \Delta CT B$$

$$\Delta CT B - \Delta CT A = \Delta \Delta CT = x$$

$$2^{-\Delta \Delta CT} = 2^{-x} = \text{relative Expression}$$

---

## **3.9 SDS-Gelelektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen**

### **3.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

#### **3.9.1.1 Einführung in die Methode**

Die SDS-Page-Gelelektrophorese ist eine Methode, die es ermöglicht, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Bei dieser Methode werden Proteine durch ein elektrisches Feld ihrer Größe bzw. molekularen Masse nach aufgetrennt. Das anionische Detergenz SDS zerstört die Disulfid-Brücken der Proteine und löst so die Tertiärstruktur auf. Meist bilden die Proteine mit dem SDS eine negativ geladene Verbindung und wandern im elektrischen Feld zu der positiv geladenen Anode. Durch die Porenstruktur des Gels werden größere Proteine eher zurückgehalten als kleinere, dadurch kommt es zu einer Auftrennung nach dem Molekulargewicht.

Es wurde die diskontinuierliche Methode nach Laemmli angewendet. Diskontinuierlich bedeutet, dass das Polyacrylamidgel eine zweiteilige Struktur aufweist und aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht. Diese beiden unterscheiden sich durch den pH-Wert und in den Anteilen an Acrylamid. Das Sammelgel hat große Poren und bündelt die Proben, so dass die Banden sich schärfer abgrenzen. Durch das Trenngel werden die Proben anschließend dem Molekulargewicht nach aufgetrennt.

#### **3.9.1.2 Durchführung der Gelelektrophorese**

Als erstes wurden zwei Spacer zwischen zwei Glasplatten positioniert und durch zwei Schraubklemmen an der Seite befestigt. Der untere Rand der Platten wurde mit Parafilm verschlossen.

Dann wurde das Trenngel auf eine Höhe von ca. 10 cm eingefüllt und mit 2-3 ml H<sub>2</sub>O überschichtet, um eine luftdichte Polymerisation zu gewährleisten. Nach der zweistündigen Polymerisationszeit wurde das Wasser abgeschüttet und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Sofort erfolgte luftbasenfrei das Einsetzen der



## Methoden

---

Profilformer. Die Polymerisationszeit des Sammelgels betrug ungefähr 15-20 Minuten.

Acrylamid-Bisacrylamid (30:1) in 500 ml Millipore Wasser

Acrylamid 146 g

Bisacrylamid 4 g

### Trenngel

<u>Gel Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)</u>	<u>12,5 %</u>	<u>7,5%</u>
--	---------------	-------------

Acrylamid	11,25 ml	7,50 ml
-----------	----------	---------

Trenngelpuffer (pH 8,6)	6,70 ml	7,50 ml
-------------------------	---------	---------

Aqua bidest.	9,00 ml	15,00 ml
--------------	---------	----------

SDS	270,00 µl	300,00 µl
-----	-----------	-----------

APS	180,00 µl	200,00 µl
-----	-----------	-----------

Temed	22,50 µl	25,00 µl
-------	----------	----------

### APS

1g auf 10 ml Millipore Wasser

### Trenngelpuffer

Tris/HCL 181,71 g/l

Auf pH 8,6 einstellen

### Sammelgelpuffer

Tris 60,57 g/l

Auf pH 6,8 einstellen

---

Sammelgel

Acrylamid	1,2 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	2,5 ml
Aqua bidest.	6,4 ml
SDS	270,0 µl
APS	100,0 µl
Temed	12,0 µl

In der Polymerisationszeit wurden die Proben, wie unter 3.3.1 beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurden die Profilformer entfernt und die Lauftaschen mit Laufpuffer befüllt, um eventuelle Acrylamidreste auszuspülen. Dann wurden mit einer Hamilton-Spritze die Proben in die einzelnen Taschen pipettiert. Die eingesetzte Probenmenge betrug jeweils 20 µl. Ein Molekulargewichtsmarker wurde jedem Lauf beigelegt.

Nun wurde das befüllte Gel in eine senkrechte Gelkammer verbracht. Der Aufsatz der Gelkammer und der Boden wurden vorsichtig mit Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden bei 200 Volt für ca. 2-4 Stunden, je nach Größe der Proteine, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

Laufpuffer für 5 l Millipore

360 g Glycin

75 g Tris

25 g SDS

### 3.9.2 Western-Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde ein weiteres Verfahren benötigt, um die Identifizierung eines bestimmten Proteins möglich zu machen. Mit Hilfe der Western-Blot-Technik können Proteine von einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Anschließend werden die Proteine mittels einer Immunfärbung sichtbar gemacht und weiter analysiert.

Von den zwei bestehenden Blotting-Methoden wurde das semi-dry-blotting-Verfahren verwendet. Sandwichartig wurden das Acrylamidgel, Membran und Filterpapier horizontal zwischen zwei Elektroden platziert. Die Membran wurde zuerst in Methanol und anschließend in Anodenpuffer angefeuchtet. Jeweils drei Filterpapiere wurden in Anodenpuffer, konzentriertem Anodenpuffer und Kathodenpuffer getränkt. Dann wurde die Blotkammer in folgender Reihenfolge bestückt: Filterpapier mit konzentriertem Anodenpuffer, Filterpapier mit Anodenpuffer, PVDF-Membran, Acrylamidgel, Filterpapier mit Kathodenpuffer (siehe Abb. 3-4). Mit einer Glaspipette wurden alle Luftblasen vorsichtig ausgestrichen, um den Transfer auf die Membran nicht zu behindern.

Der Blotvorgang erfolgte je nach Größe des Proteins für 1-3 Stunden bei einer Spannung von 90 mA. Nach der Entnahme aus der Blotkammer wurde die Membran mit aqua bidest. gespült, um Pufferreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

#### Konzentrierter Anodenpuffer

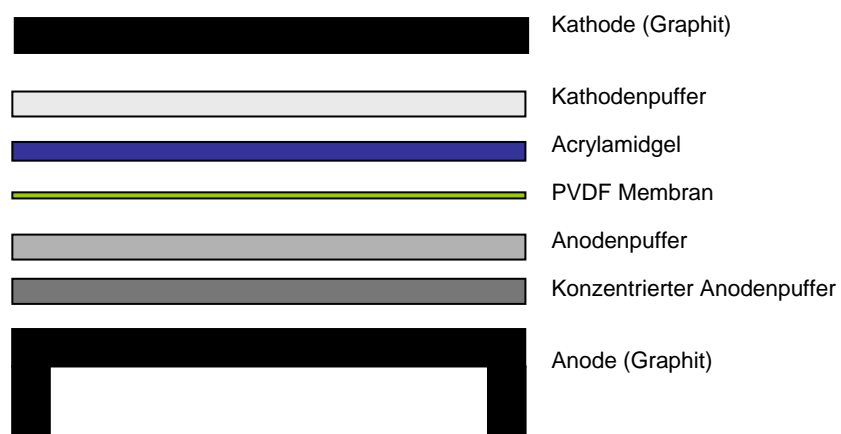
Tris/Hcl	36,3 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	800 ml
pH 10,4	

Anodenpuffer

Tris/Hcl	3,63 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	800 ml
pH 10,4	

Kathodenpuffer

Tris/Hcl	3,03 g
6-Aminohexansäure	5,25 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	800 ml
pH 9,4	

**Abb. 3-5 Sandwichstruktur des semidry Blotverfahrens**

### 3.9.3 Dot blot

Dot blot ist der englische Begriff für das punktförmige Auftragen einer Proteinprobe auf eine Membran. Die Dot blot-Methode ist eine zeitsparende Vereinfachung des Western blots. Die gesuchten Proteine werden nicht zuerst mittels Gelelektrophorese separiert und dann in einem ein bis dreistündigen Blotvorgang auf eine Membran übertragen, sondern direkt mit Hilfe einer Dot blot-Kammer punktförmig auf eine Membran transferiert. Allerdings kann mit diesem Verfahren nur die An- oder Abwesenheit eines Proteins bestätigt werden, Aussagen über die Größe des gesuchten Proteins sind nicht möglich. Existieren verschiedene Formen des Proteins, so werden diese nicht einzeln, sondern als ein Punkt dargestellt.

Für das Dot blot-Verfahren wurde eine MINIFOLD-Kammer verwendet, die angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe ein Vakuum erzeugt und so die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert.

Ein Filterpapier und die PVDF-Membran wurden auf die Größe der Dot blot-Kammer zugeschnitten. Die Membran wurde zuerst in 70%igem Methanol, anschließend in nichtkonzentriertem Anodenpuffer getränkt und dann auf das in Anodenpuffer eingeweichte Filterpapier gelegt. Um den Transfer des Proteins nicht zu stören, wurden eventuell vorhandene Luftblasen vorsichtig mit einer Glaspipette ausgestrichen. Dann wurde der Deckel der Blotkammer aufgesetzt und die Kammer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Nun wurden 20 µl Probe auf den Boden in die Vertiefung der Blot-Kammer pipettiert. Nach fünf Minuten wurde mit 20 µl Anodenpuffer gespült, um das Verfahren zu beenden.

### 3.9.4 Immunfärbung

Die verwendete Methode basiert auf folgendem Prinzip: ein unmarkierter spezifischer Primärantikörper bindet das auf der Membran fixierte Protein. Nun wird der Primärantikörper durch einen zweiten Antikörper, der mit dem Enzym alkalische Phosphatase markiert ist, gebunden. So wird durch ein indirektes Verfahren der Primärantikörper sichtbar gemacht und das Signal verstärkt.

Falls sich die Immunfärbung nicht direkt dem Blotvorgang anschloss, mussten die getrockneten Membranen durch das Verbringen in Methanol und nachfolgend in aqua bidest. erneut angefeuchtet werden. Dann wurden sie für 1 Stunde in BSA verbracht, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dadurch kann den Antikörpern das Binden an ihre spezifische Bindungsstelle erleichtert und der störende Hintergrund reduziert werden. Vor der Zugabe des Erstantikörpers wurde ein zweimaliger Waschschrift, für jeweils 5 Minuten, mit TBS durchgeführt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Daran schloss sich ein zweimaliger Waschschrift, für jeweils 5 Minuten, mit 0,1% (v/v) Triton in TBS an. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1 Stunde. Anschließend folgten wieder zwei fünfminütige Waschschriffe mit 0,5% (v/v) Triton in TBS, bevor die Membran für kurze Zeit in AP-Puffer verbracht wurde. In dieser Zeit wurde die Färbelösung hergestellt.

#### Färbelösung

AP-Puffer	50 ml
BCIP	7 mg
NBT	15 mg

Das Enzym alkalische Phosphatase, gekoppelt an den Zweitantikörper, katalysiert hier die Dephosphorylierung des BCIP und die Reduktion des NBT, wodurch ein blau-violettes Präzipitat entsteht. Die Membran verblieb, je nach Antikörper, unter Lichtausschluss für 5–10 Minuten in der Färbelösung. Anschließend wurde die

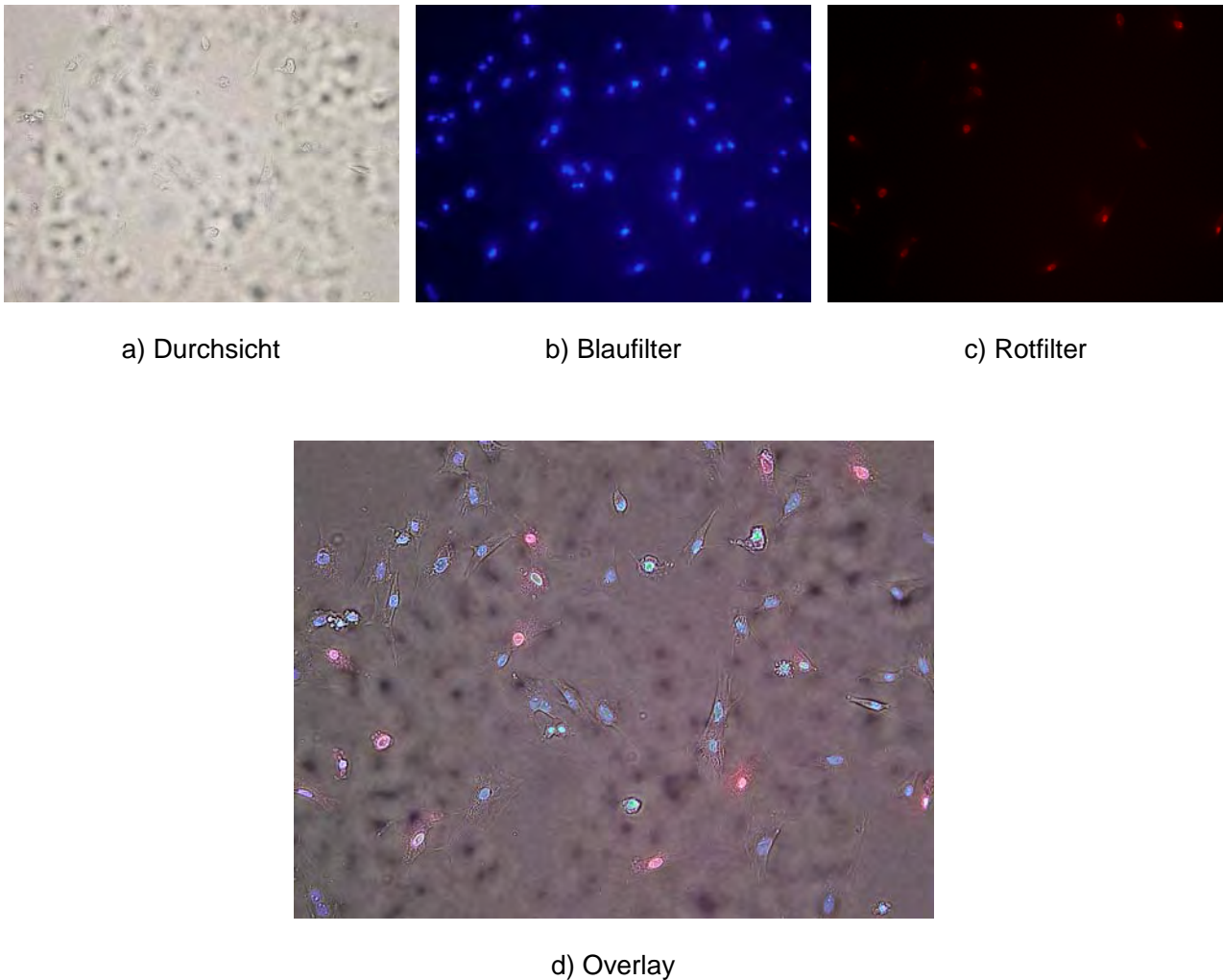
Reaktion mit aqua bidest. abgestoppt und die Membran getrocknet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Image Quant.

### 3.10 Apoptose Assay

Die Quantifizierung der Apoptoserate erfolgte mit einem Hoechst Assay. Hierfür wurden die Farbstoffe Hoechst H33258 und Propidiumjodid verwendet. Der Hoechst Farbstoff H33258 ist ein DNA-Farbstoff, der in die Zelle aufgenommen wird und das Chromatin der Zellkerne anfärbt. Die veränderte Chromatinstruktur apoptotischer Zellen kann durch die intensive blaue Fluoreszenz des Farbstoffes sehr gut sichtbar gemacht werden. Die Anregungswellenlängen für HOE liegen bei 340-360 nm. Das Propidiumjodid ist im Gegensatz dazu kein membrangängiger Farbstoff und wird nur von Zellen mit geschädigter Zellmembran aufgenommen. So zeigen propidiumjodidhaltige nekrotische Zellen bei Anregung im Spektrum von 510-550 nm eine intensiv rote Fluoreszenz.

Die Zellen wurden für den Apoptose-Assay wie unter 3.3.1 beschrieben in einer bestimmten Zelldichte (30000 Zellen je Schale) ausplattiert und ein Teil für 48 Stunden mit Nikotin inkubiert. Der andere Teil blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Nach 48 Stunden wurden den Zellen die beiden Farbstoffe HOE33258 (5 µl/ml) und Propidiumjodid (5 µl/ml) zugegeben und für 10 Minuten im Wärmeschrank inkubiert.

Die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 ausgewertet. Bei jedem zufällig gewählten Gesichtsfeld wurden jeweils drei Fotos angefertigt: ein Bild im Durchlicht, eines im Rotfilter und eines im Blaufilter (Abb. 3-6). Mit Hilfe der Software wurde dann ein Overlay dieser drei Bilder angefertigt und die Gesamtzellzahl des Ausschnittes ausgezählt. Anschließend wurde der Anteil der nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl ausgewertet. Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis in der Summe mehr als 200 Zellen pro Versuchsbedingung pro Schale erfasst waren.

**Abb. 3-6 fluoreszenzmikroskopische Ausschnitte des Apoptose-Assays**

Dargestellt sind Bildausschnitte des Apoptose-Assays, die mit dem Fluoreszenzmikroskop angefertigt wurden. (a) zeigt die Durchsicht, (b) die Zellen des Gesichtsfeldes im Blaufilter und (c) im Rotfilter. Im Overlay (d) wurde zuerst die Gesamtzellzahl des Gesichtsfeldes ermittelt und anschließend der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt: nekrotische Zellen waren an einem roten Zellkern zu erkennen, apoptotische Zellen hatten eine veränderte Zellform und einen türkis-blauen Zellkern. Gesunde Zellen zeichneten sich durch eine längliche Zellform und einen blauen Zellkern aus. Insgesamt wurden je Schale 200 Zellen ausgezählt.



### 3.11 Spontan hypertensive Ratten als *In vivo*-Modell

Zusätzlich zu den Untersuchungen an isolierten Endothelzellen wurde an spontan hypertensiven Ratten der Effekt von Nikotin auf die PTHrP-Expression *in vivo* untersucht. Die SHR-Tiere stammten aus einer 2007 durchgeführten Studie von Meurrens et al, die den Einfluss von Nikotin auf das Fortschreiten einer Myokardhypertrophie untersuchte. Diese Tiere wurden mit einem festgelegten Berauchungs-Protokoll über einen Zeitraum von 30 oder 90 Tagen beraucht. In diesem Zeitraum wurden sie 5 Tage in der Woche täglich für zweieinhalb Stunden in eine Versuchsvorrichtung verbracht. Das Berauchungsprotokoll sah nach einer Stunde Berauchung eine Pause von einer halben Stunde vor, der sich eine weitere Stunde Berauchung anschloss. Die Berauchung erfolgte mit standardisiertem Zigarettenrauch, während die Kontrollgruppen in dieser Zeit unbehandelte Frischluft erhielten.

Nach Ende des Versuchs wurden die Rattenherzen, wie unter 3.1 beschrieben, gewonnen und die RNA aus den Ventrikeln, wie unter 3.4 beschrieben, isoliert und für die real-time PCR aufgearbeitet.

### 3.12 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden als Median oder als Mittelwert ( $\bar{x}$ )  $\pm$  s.e.m. aus  $n$  unabhängigen Experimenten dargestellt, wie in den jeweiligen Bildunterschriften angegeben. Statistische Differenzen wurden mittels ANOVA mit nachfolgendem Duncan-Test als post-hoc-Analyse analysiert, wenn bei einem Experiment mehr als eine Gruppe verglichen wurde. In Experimenten, bei denen zwei Gruppen verglichen wurden, wurde ein Student's T-Test für gepaarte Proben angewendet. Als statistisch signifikant galten Differenzen mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

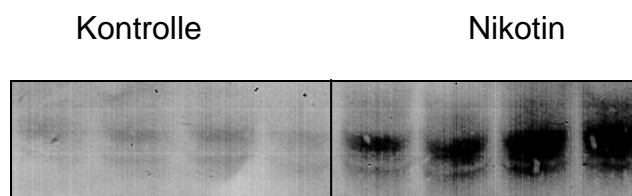
Die Darstellung der Expressionsanalysen erfolgte als box-and-whiskers-plots. Die obere und untere Begrenzung der Box entspricht jeweils dem 25% und 75% Quartil. In die Box selbst wird der Median eingezeichnet. Die Whiskers („Schnurrhaare“) werden an das obere und untere Ende der Box angehängt und definieren üblicherweise das 10% Quartil. Die außerhalb dieses Bereichs liegenden Extremwerte werden als separate Punkte eingezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Effekt einer nAChR Stimulierung auf die PTHrP-Expression

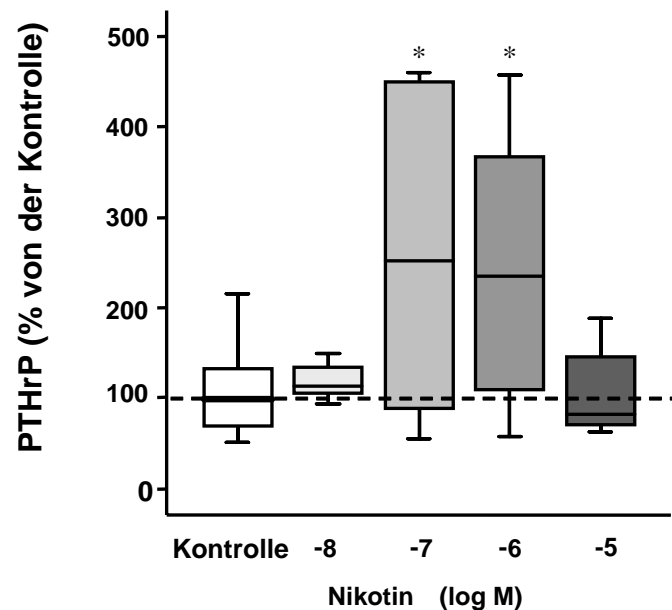
#### 4.1.1 Der Einfluss von unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen auf die PTHrP-Expression

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Nikotin auf die PTHrP-Expression in Endothelzellen untersucht. Hierzu wurden Endothelzellen mit unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen ( $10^{-8}$ – $10^{-5}$  mol/l) für 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte mittels Western blot (Abb. 4-1). Es konnte gezeigt werden, dass Nikotin einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die PTHrP-Expression hat (Abb. 4-2). Eine signifikante Steigerung der PTHrP-Expression konnte mit den Nikotinkonzentrationen 1,0  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M erreicht werden.



**Abb. 4-1** Dargestellt ist ein repräsentativer Western-blot der PTHrP-Expression

Die ersten vier Banden zeigen die Kontrollen, Banden fünf bis acht zeigen Kulturen, die mit 1  $\mu$ M Nikotin behandelt wurden. Die nikotinstimulierten Kulturen zeigen eine signifikante Expressionssteigerung um 140%, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen.



**Abb. 4-2 Konzentrationsabhängige Stimulation der PTHrP-Expression**

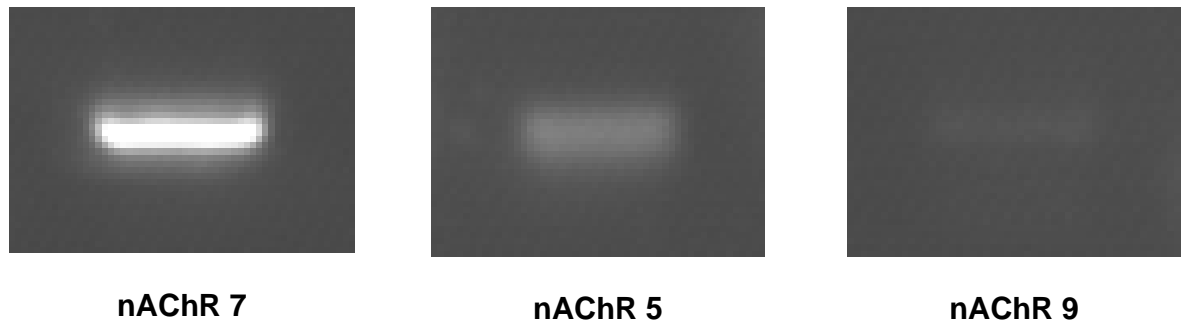
Im Boxplot ist die Auswirkung der unterschiedlich verwendeten Nikotinkonzentrationen auf die PTHrP-Expression dargestellt. Der Median der PTHrP-Expression in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 100% gesetzt. 25% 75% Quartil; 5% 95% Percentil; n=8; ANOVA: \* p=0,01 vs. Kontrolle. Die Inkubation mit 1,0  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M Nikotin führte zu einer signifikanten Expressionssteigerung des PTHrP.

#### 4.1.2 Expression von nACh-Rezeptoren in mikrovaskulären Endothelzellen

Nikotin führte in den isolierten Endothelzellen zu einer Expressionssteigerung des PTHrP. Da Nikotin als natürlicher Agonist über den nAChR wirkt, wurde um den genauen Signalweg aufzuklären, die Expression der acht  $\alpha$ -nAChR-Isoformen in den Endothelzellen quantifiziert. Zur Identifizierung der vorhandenen  $\alpha$ -Untereinheiten wurde eine RT-PCR durchgeführt und anschließend wurden die amplifizierten Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Es wurden nur die  $\alpha$ -Untereinheiten detektiert, da diese die Bindungsdomäne für den Agonisten tragen.

In den Endothelzellen konnten von den acht  $\alpha$ -Untereinheiten, die in Säugetieren vorkommen, drei nachgewiesen werden, wobei die dominierende Untereinheit die  $\alpha$ 7-Untereinheit war (Abb. 4-3). Des Weiteren konnten in geringem Maß  $\alpha$ 5- und  $\alpha$ 9-

Untereinheiten detektiert werden. Die anderen  $\alpha$ -Untereinheiten konnten in den Endothelzellen nicht nachgewiesen werden.

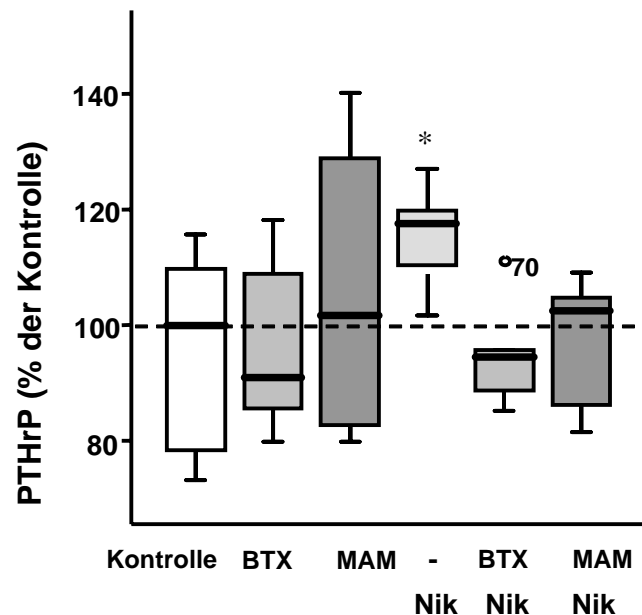


**Abb. 4-3 nAChR in Endothelzellen**

Die dargestellten Bilder zeigen ein repräsentatives Agarosegel, das mit den amplifizierten Proben aus der RT-PCR beladen wurde. Die Banden fluoreszierten durch den verwendeten Farbstoff SYBR<sup>®</sup>safe unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Kontrolle wurde auch die Aktin-Expression bestimmt.

#### **4.1.3 Einfluss der spezifischen und unspezifischen Hemmung der nAChR auf die PTHrP-Expression**

Um die Beteiligung der nAChR an der Stimulation der PTHrP-Expression zu bestätigen, wurden ein spezifischer und ein unspezifischer nAChR-Hemmstoff verwendet. Die kultivierten Endothelzellen wurden mit 1  $\mu$ M Nikotin stimuliert und entweder mit dem spezifischen  $\alpha$ 7-nAChR-Hemmstoff Bungarotoxin (1  $\mu$ M) oder dem unspezifischen nAChR-Hemmstoff Mecamylamin (1  $\mu$ M) inkubiert. Ein Teil der Endothelzellen blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Der Eigeneffekt der Inhibitoren wurde überprüft, indem Endothelzellen nur mit einem Inhibitor, entweder Bungarotoxin oder Mecamylamin, inkubiert wurden. Die Auswertung der PTHrP-Expression mittels Western-blot zeigte eine signifikante Steigerung der PTHrP-Expression durch Nikotin. In Anwesenheit der Inhibitoren konnte keine Expressionsteigerung durch Nikotin mehr erreicht werden.

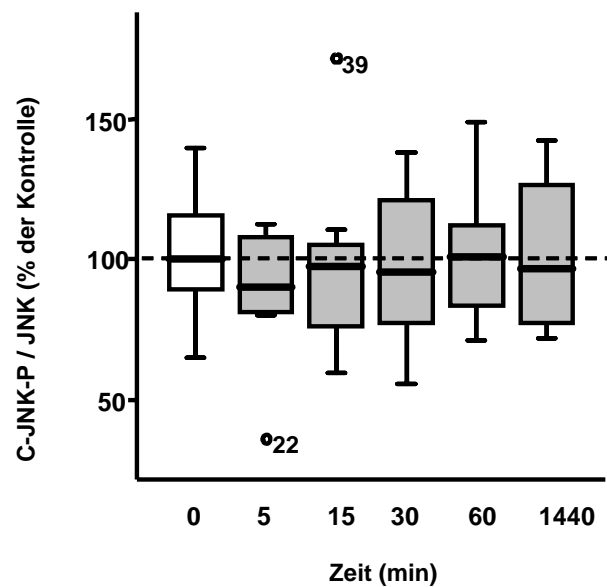


**Abb. 4-4 PTHrP-Expression nach Verwendung der spezifischen und unspezifischen Inhibitoren Mecamylamin und Bungarotoxin**

Der Boxplot zeigt den Median der PTHrP-Expression (25% 75% Quartil; 5% 95% Percentil). Nik ist Nikotin behandelt, BTX ist Bungarotoxin, MAM ist Mecamylamin. Der Median der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Steigerung der PTHrP-Expression durch Nikotin wurde durch die Anwesenheit der Inhibitoren gehemmt ( $n=8$ , ANOVA: \*  $p=0,036$  vs. Kontrolle).

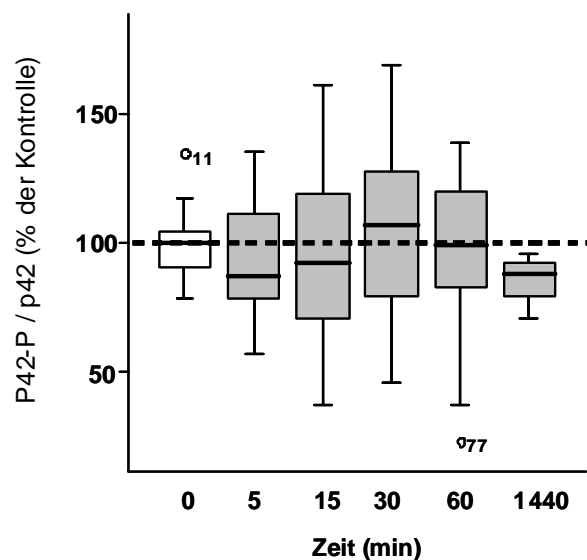
#### 4.1.4 Beteiligung von MAP-Kinasen an der nikotinerg aktivierten Signaltransduktion

Zur genaueren Charakterisierung des Signalweges, der sich den nAChR anschließt, wurde die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der MAP-Kinasen untersucht. Kultivierte Endothelzellen wurden mit 1  $\mu$ M Nikotin stimuliert und nach 0, 5, 15, 30, 60 und 1.440 Minuten geerntet. Als Bezugsgröße wurde die Expression der MAP-Kinasen in den unbehandelten Kontrollen gewählt (0 Minuten). Im Dot blot zeigten die MAP-Kinasen JNK (Abb. 4-5) und p42 (Abb. 4-6) keine signifikante Aktivierung durch Nikotin im Vergleich zur Kontrolle, die Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase hingegen stieg nach 15 Minuten signifikant um  $22,7 \pm 2\%$  an (Abb. 4-7).



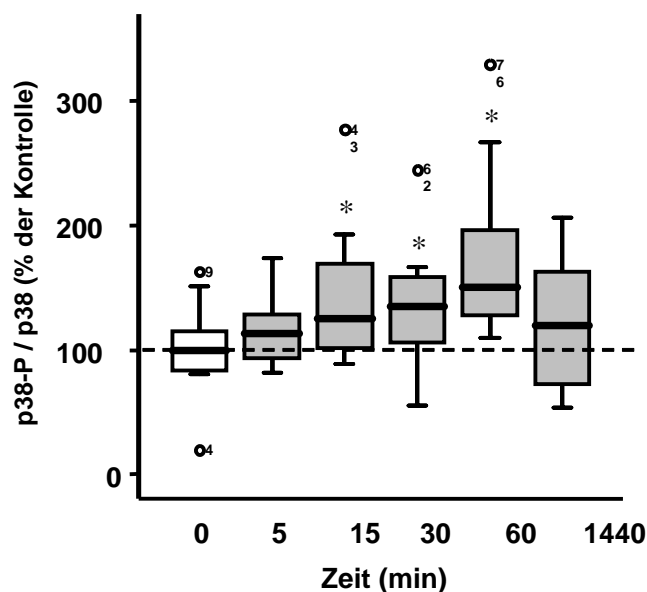
**Abb. 4-5 Einfluss einer nAChR Aktivierung auf die MAPK C-JNK**

Dargestellt ist die zeitabhängige Expression der JNK-Kinase. Der Boxplot zeigt den Median (25% 75% Quartil; 5% 95% Percentil) der aktivierten JNK-Kinase (C-JNK-P) bezogen auf die nicht aktivierte JNK-Kinase. Der Median der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Es konnte keine Phosphorylierung der JNK-Kinase durch Nikotin bzw. eine nAChR Aktivierung beobachtet werden (n=12, ANOVA: \* p=0,91 vs. Kontrolle).



**Abb. 4-6 Einfluss einer nAChR Aktivierung auf die p42-MAP-Kinase**

Dargestellt ist die zeitabhängige Expression der p42-MAP-Kinase. Im Boxplot dargestellt ist der Median (25% 75% Quartil, 5% 95% Percentil) der aktivierten p42-MAP-Kinase (p42-P) bezogen auf die nicht aktivierte p42-MAP-Kinase. Der Median der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Es konnte keine Phosphorylierung der p42-MAP-Kinase durch Nikotin bzw. eine nAChR Aktivierung beobachtet werden (n=16, ANOVA: \* p=0,82 vs. Kontrolle).

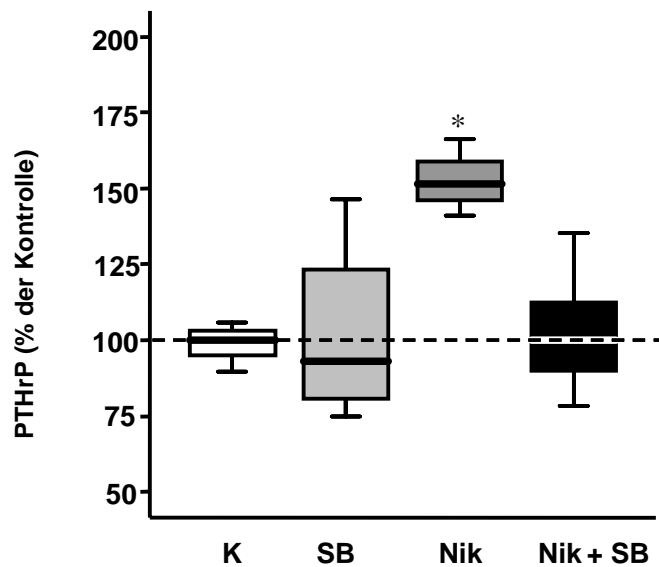


**Abb. 4-7 Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch die Stimulierung der nAChR in Endothelzellen**

Dargestellt ist die zeitabhängige Expression der p38-MAP-Kinase. Im Boxplot dargestellt ist der Median (25% 75% Quartil, 5% 95% Percentil) der aktivierten p38-MAP-Kinase (p38-P) bezogen auf die nicht aktivierte p38-MAP-Kinase. Der Median der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Nach 15 Minuten konnte eine signifikante Aktivitätssteigerung der p38-MAP-Kinase durch Nikotin beobachtet werden (n=16, ANOVA: \* p=0,008 vs. Kontrolle).

#### 4.1.5 Effekt der p38-MAP-Kinase Hemmung auf die Nikotin stimulierte PTHrP-Expression

Um zu bestätigen, dass die p38-MAP-Kinase in den Nikotin-Effekt der PTHrP-Expressionssteigerung involviert ist, wurde die p38-MAP-Kinase mit dem Inhibitor SB202190 gehemmt. Kultivierte Endothelzellen wurden mit dem Inhibitor SB202190 (10  $\mu$ M) behandelt und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Nikotin zugegeben und nach 24 Stunden die PTHrP-Expression mittels Dot blot bestimmt. Neben den unbehandelten Kontrollen diente ein Teil der Kulturen als Funktionskontrolle für den Inhibitor. Nikotin führte zu einer signifikanten Expressionssteigerung des PTHrP um 50 % (p=0,02). In Anwesenheit des Inhibitors hatte die Inkubation mit Nikotin keine Expressionssteigerung zur Folge, die Expression war vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen (Abb. 4-8).



**Abb. 4-8 Hemmung des Nikotineffekts durch den p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB202190**

Das Schaubild zeigt den Median der PTHrP-Expression in Gegenwart des Inhibitors (SB), von Nikotin (Nik) und Nikotin mit dem Inhibitor (Nik+SB). Der Median der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt (25% 75% Quartil, 5% 95% Percentil). In Gegenwart des Inhibitors konnte keine Expressionssteigerung des PTHrP durch Nikotin mehr erreicht werden (n=6, ANOVA: \* p=0,02 vs. Kontrolle).

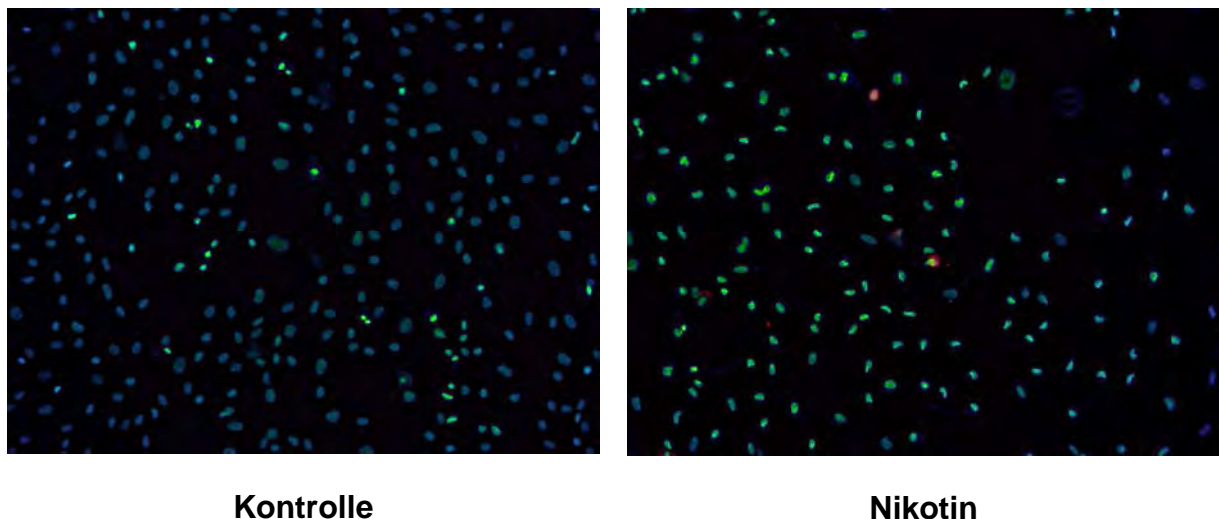


## 4.2 Auswirkung von Nikotin auf die Apoptose-Suszeptibilität in Endothelzellen

### 4.2.1 Bestimmung der Apoptoserate mit dem Hoechst-Assay

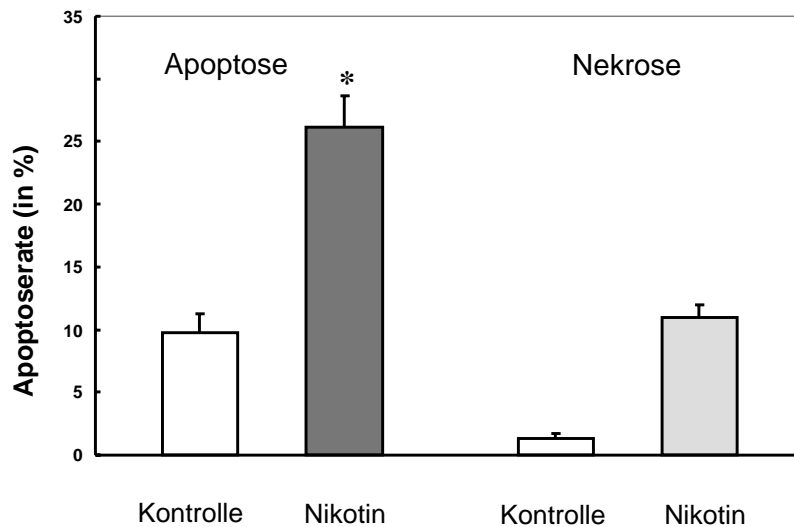
Die erste Versuchsreihe konnte zeigen, dass Nikotin die PTHrP-Expression in Endothelzellen signifikant steigert. PTHrP führt in Endothelzellen zu einer erhöhten Apoptoseresistenz (Schorr et al., 2003). Die zweite Fragestellung sollte nun klären, ob die Stimulation der nAChR und eine daraus resultierende Steigerung der PTHrP-Expression zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führt.

Im Apoptose-Assay wurde der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Kultivierte Endothelzellen wurden für 48 Stunden mit Nikotin stimuliert und anschließend mit den Farbstoffen Hoe33258 und Propidiumjodid für 15 Minuten inkubiert. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Apoptoserate bestimmt (Abb. 4-9). In den Kontrollschalen konnte eine basale Apoptoserate von 9% nachgewiesen werden. In den nikotinstimulierten Kulturen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Apoptose auf  $26\pm 3\%$  (Abb. 4-10) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen (n=2600 ausgezählte Zellen).



**Abb. 4-9 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Apoptose in Endothelzellen**

Das linke Bild zeigt unbehandelte Endothelzellen nach 48 Stunden. Rechts sind isolierte Endothelzellen der Ratte nach 48 stündiger Nikotinstimulation ( $1\ \mu\text{M}$ ) zu sehen. Die Zellkerne gesunder Zellen sind blau angefärbt, apoptotische Kerne leuchten grün, nekrotische Zellen rot.

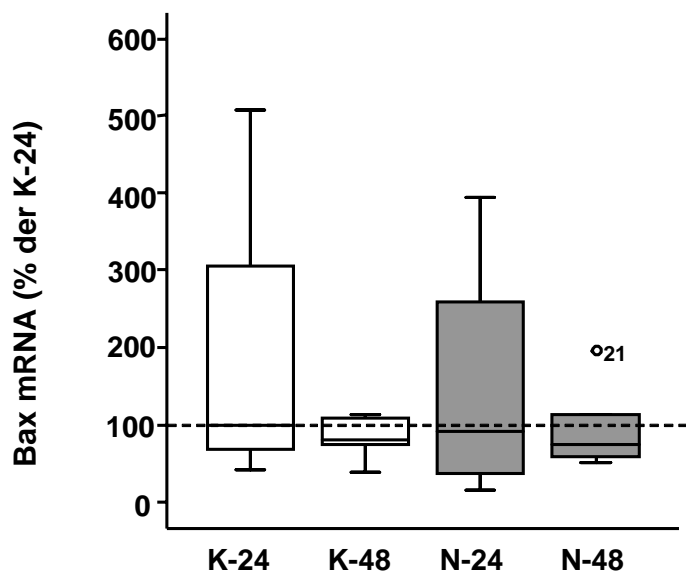


**Abb. 4-10 Veränderung der Apoptoserate in Endothelzellen durch Nikotin**

Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von apoptotischen und nekrotischen Zellen nach 48 stündiger Nikotininkubation. Eine signifikante Steigerung der Apoptose um  $288,9 \pm 17\%$  im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen konnte beobachtet werden. Auch der Anteil nekrotischer Zellen stieg um den Faktor  $5,5 \pm 0,8$  gegenüber den Kontrollzellen.

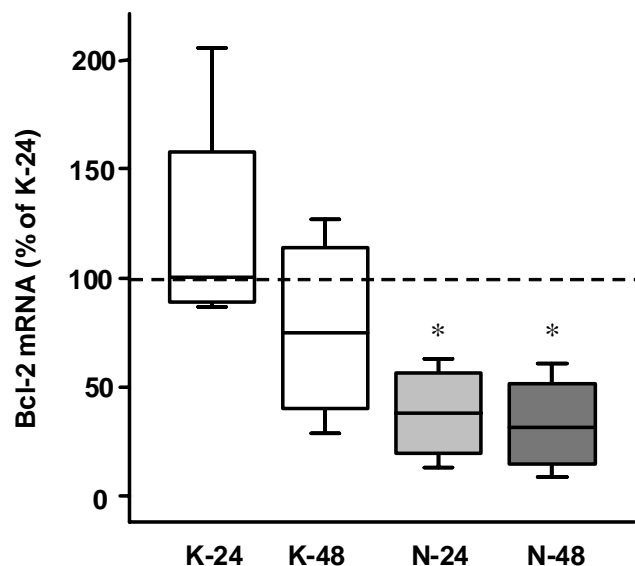
#### 4.2.2 Untersuchung pro- und anti-apoptotischer Gene

Nikotin führte im Apoptose-Assay nach 48 Stunden zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen. Daraufhin wurde die Expression des pro-apoptotischen Gens Bax und des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 untersucht. Die Expression wurde auf mRNA Ebene mittels real-time RT-PCR und auch auf Proteinebene bestimmt. Endothelzellen wurden für 24 und 48 Stunden mit Nikotin inkubiert und anschließend die Bcl-2 und Bax Expression ermittelt. Während Bax (Abb. 4-11) keine Expressionsänderungen zeigte, kam es zu einer signifikanten Reduktion der Bcl-2 Expression (Abb. 4-12) nach 24 und 48 Stunden.



**Abb. 4-11 mRNA Expression von Bax nach 24 und 48 Stunden Nikotinstimulation**

Im Boxplot dargestellt ist der Median der mRNA-Konzentrationen des pro-apoptotischen Gens Bax nach 24 und 48stündiger Nikotinstimulation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (25% 75% Quartil, 5% 95% Percentil). Der Median der Kontrolle nach 24 Stunden wurde auf 100% gesetzt. Es konnten keine signifikanten Änderungen in der Expression festgestellt werden (n=4, ANOVA: \* p=0,793 vs. Kontrolle).



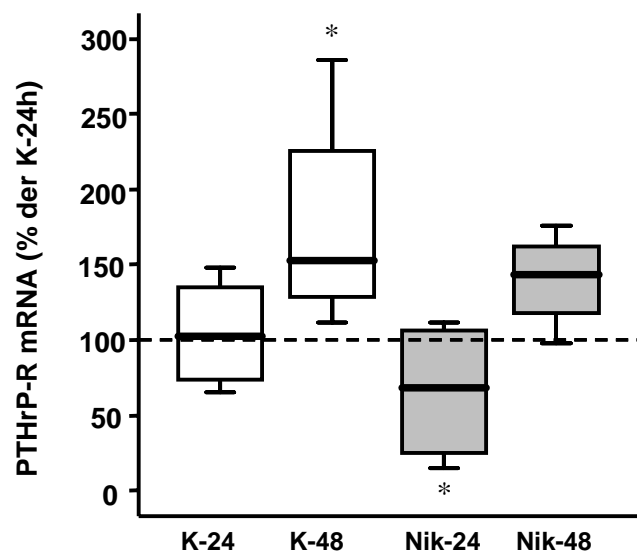
**Abb. 4-12 mRNA Expression von Bcl-2 nach 24 und 48 Stunden Nikotinstimulation**

Dargestellt sind die mRNA-Konzentrationen des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 nach 24 und 48 stündiger Nikotinstimulation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Der Median der Kontrolle nach 24 Stunden wurde auf 100% gesetzt (25% 75% Quartil, 5% 95% Percentil). Eine signifikanten Herabregulation der Expression von  $55 \pm 5\%$  konnte bereits nach 24 Stunden festgestellt werden (n=4, ANOVA: \* p=0,021 vs. Kontrolle).

### 4.2.3 Auswirkung der Nikotinstimulierung auf den PTHrP-Rezeptor

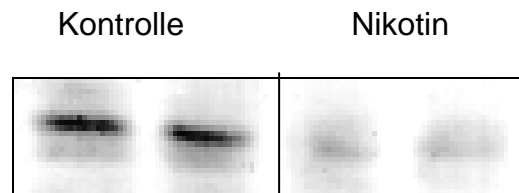
Die Messung des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 zeigte eine Reduktion der Expression unter Nikotinstimulierung, obwohl eine signifikant höhere PTHrP-Expression vorlag. Als Ursache wurde ein parakriner Effekt vermutet und die PTHrP-Rezeptor Expression, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, gemessen. Kultivierte Endothelzellen wurden mit 1  $\mu$ M Nikotin für 24 und 48 Stunden inkubiert und anschließend wurde in der real-time RT-PCR die Menge der PTHrP-Rezeptor mRNA gemessen. Zusätzlich wurde im Western blot die Proteinmenge bestimmt (Abb. 4-13, 4-14).

*In vitro* konnte eine Herabregulierung des Rezeptors beobachtet werden. In den kultivierten Endothelzellen sank die Rezeptor-Expression nach 24 Stunden um  $40\pm 3\%$  im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 Stunden war kein Unterschied in der Expression mehr zu messen.



**Abb. 4-13 mRNA Expression des PTHrP-Rezeptors nach 24 und 48 Stunden Nikotinstimulation**

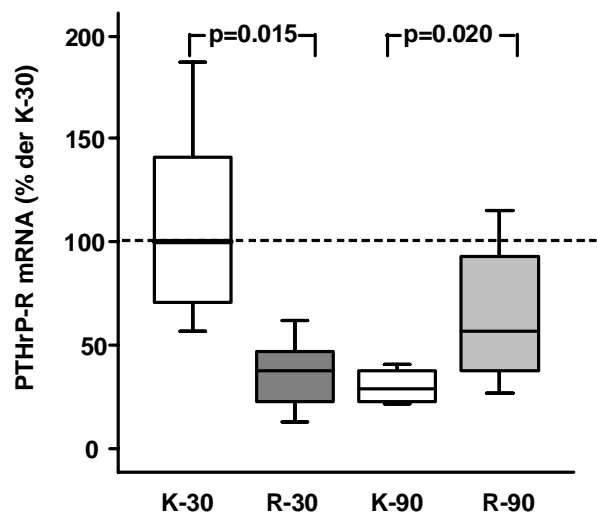
Der Boxplot zeigt die mRNA-Konzentrationen des PTHrP-Rezeptors nach 24 und 48 stündiger Nikotinstimulation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Der Median der Kontrolle nach 24 Stunden wurde auf 100% gesetzt (25% 75% Quartil, 5% 95% Perzentil). Eine signifikante Änderung in der Expression konnte nach 24 Stunden Nikotinstimulation festgestellt werden ( $n=4$ , ANOVA: \*  $p=0,033$  vs. Kontrolle). Die unbehandelten Zellen zeigten nach 48 Stunden einen signifikanten Anstieg der PTHrP-Rezeptorexpression.



**Abb. 4-14 Expression des PTHrP-Rezeptors nach 24 Stunden Nikotinstimulation**

Dargestellt ist ein repräsentativer Western blot, der die Expression des PTHrP-Rezeptors nach 24stündiger Nikotinstimulation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zeigt. Eine signifikante Änderung um 55% im Vergleich zu den Kontrollen in der Expression konnte nach 24 Stunden Stimulierung mit 1  $\mu$ M Nikotin festgestellt werden.

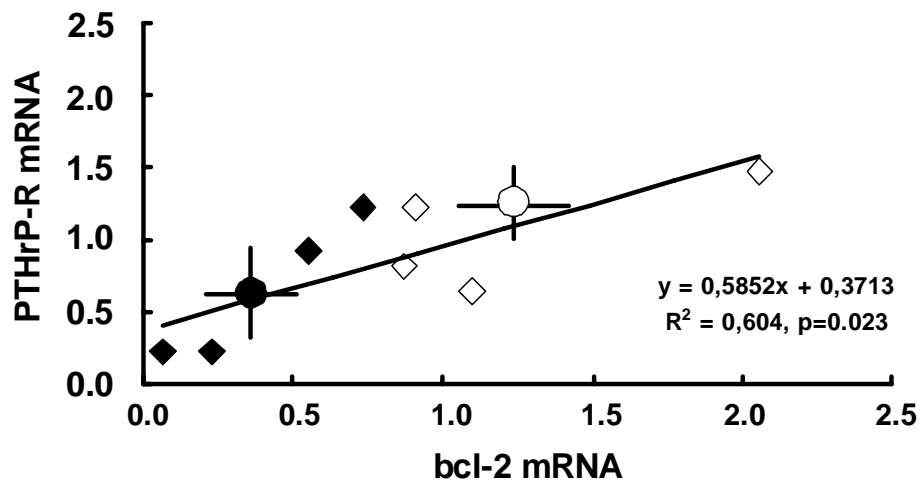
Als *in vivo* Modell dienten Spontan Hypertensive Ratten, diese wurden 30 bzw. 90 Tage standardisiertem Zigarettenrauch ausgesetzt und anschließend wurde aus dem linken Ventrikel die Menge der PTHrP-Rezeptor mRNA bestimmt. Auch *in vivo* konnte eine signifikante Herabregulation des Rezeptors nach 30 Tagen beobachtet werden. (Abb. 4-15). Die Kontrolle nach 90 Tagen zeigte eine wesentlich niedrigere Expression des Rezeptors als die Kontrolle nach 30 Tagen.



**Abb. 4-15 Expression des PTHrP-Rezeptors in spontan Hypertensiven Ratten nach 30 und 90 Tagen Exposition mit Zigarettenrauch**

Dargestellt ist die Expression des PTHrP-Rezeptors in SHR nach 30 und 90 Tagen Berauchung mit standardisiertem Zigarettenrauch im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Angegeben ist der Median, 25% 75% Quartil, 5% 95% Percentil. Der Median der Kontrolle nach 30 Tagen wurde auf 100% gesetzt. (n=6-9 Tiere, Mann-Whitney-U: \* p=0,015 vs. Kontrolle).

Wurde die Expression des PTHrP-Rezeptors und die des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 genauer betrachtet, zeigte sich, dass eine positive Korrelation besteht (Abb. 4-16). Je mehr PTHrP-Rezeptor mRNA vorlag, desto mehr Bcl-2 mRNA konnte gemessen werden.



**Abb. 4-16 Korrelation zwischen der Expression der PTHrP-Rezeptor mRNA und Bcl-2**

Dargestellt ist die Expression der mRNA des PTHrP-Rezeptors im Vergleich zu der Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2. Schwarze Symbole repräsentieren nikotin-behandelte Zellen, weiße Symbole sind Kontrollzellen.

## 5 Diskussion

PTHrP werden eine Vielzahl von Aufgaben zugeschrieben, sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen. Eine wichtige Rolle spielt PTHrP bei der Apoptoseempfindlichkeit der Endothelzellen. PTHrP ist in der Lage, die Apoptoserate in Endothelzellen signifikant zu reduzieren (Schorr et al., 2004). Endogen freigesetztes PTHrP hat am Herzen als parakriner Faktor eine wichtige Bedeutung, sowohl in der Regulation des koronaren Blutflusses als auch im Rahmen der postischämischen Erholung (Degenhardt et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wurden *in vitro* Signaltransduktionsschritte charakterisiert, die an der Regulation einer nikotinerg induzierten Steigerung der PTHrP-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen beteiligt sind. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob durch eine nikotinerg aktivierte PTHrP-Expressionsteigerung eine erhöhte Apoptoseresistenz in Endothelzellen erreicht werden kann. So könnte möglicherweise auch an Herzgefäßen durch eine nikotinerge Rezeptorstimulation über einen ähnlichen Mechanismus wie am alzheimererkrankten Gehirn einer Gefäßrarefizierung entgegen gewirkt und ein anti-apoptotischer Effekt erzielt werden.

In dieser Arbeit wurden besondere Schwerpunkte auf die Aufklärung der rezeptorvermittelten Signaltransduktion und den zugrunde liegenden Mechanismen der gesteigerten Apoptoseempfindlichkeit der behandelten Endothelzellen gelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf Erkenntnissen früherer Experimente, die an spontan hypertensiven Ratten gewonnen wurden. Diese zeigten nach der Berauchung mit standardisiertem Zigarrettenrauch eine gesteigerte PTHrP-Expression (Meurrens et al., 2007).

---

## 5.1 Hauptbefunde

- In mikrovaskulären Endothelzellen dominieren die  $\alpha 7$ -Untereinheiten des nAChR. Nikotin bindet an die  $\alpha 7$ -Untereinheiten und führt zu einer Aktivierung des Rezeptors.
- Eine Stimulation der Endothelzellen mit Nikotin führt zu einer signifikanten Expressionssteigerung von PTHrP.
- Nikotin bindet an den nAChR und aktiviert die p38-MAP-Kinase. Eine Hemmung der p38-MAP-Kinase verhindert eine Expressionssteigerung des PTHrP durch Nikotin.
- Nach 24 Stunden Nikotinstimulation wird das anti-apoptotische Gen Bcl-2 signifikant herabreguliert. Dies wirkt sich auch auf die Apoptoserate der Endothelzellen aus, die nach 48 Stunden in nikotinbehandelten Zellen signifikant angestiegen ist.
- Der PTHrP-Rezeptor ist sowohl *in vitro* nach 24 Stunden, als auch *in vivo* nach 30 Tagen durch eine Nikotinstimulation herabreguliert. Zwischen der Expression des PTHrP-Rezeptors und der des Bcl-2 konnte eine positive Korrelation nachgewiesen werden.

## 5.2 Nikotinerg vermittelte Steigerung der PTHrP-Expression

Die neuronalen nAChR wurden ursprünglich nur in Nervenzellen und dem Gehirn nachgewiesen. Mittlerweile konnten ebenfalls in anderen Zellen funktionelle neuronale nAChR identifiziert werden, z.B. in humanen Epithelzellen der Bronchien (Heeschen et al., 2001; Heeschen et al., 2002), in Astrozyten (Sharma et al., 2002) und auch in mikrovaskulären Endothelzellen (Brüggmann et al., 2002). Das Vor-



kommen dieser Rezeptoren in nicht-neuronalen Geweben lässt auch hier eine Bedeutung für die Signaltransduktion vermuten.

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte koronare mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte auf die Expression von funktionellen nAChR hin untersucht. Von den 8 bekannten  $\alpha$ -Untereinheiten, die in Säugetierzellen exprimiert werden, konnten  $\alpha 7$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 9$ -Untereinheiten in den Endothelzellen detektiert werden. Von den drei nachgewiesenen Isoformen spielte die  $\alpha 7$ -Untereinheit, die in der Lage ist, hetero- und homomere Rezeptoren zu bilden, hierbei die dominierende Rolle.

Eine Studie von Nakayama et al. (2001) konnte zeigen, dass in PC12h Zellen nAChR, die  $\alpha 7$ -Untereinheiten enthielten, bereits bei Nikotinkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  aktiviert wurden und zu einem Kalziumeinstrom führten. Ein Kalziumeinstrom konnte bei nAChR ohne funktionelle  $\alpha 7$ -Untereinheit erst durch Nikotinkonzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  gemessen werden.

Wurden Endothelzellen über 24 Stunden mit Nikotin inkubiert, konnte eine Steigerung der PTHrP-Expression beobachtet werden. Diese Expressionssteigerung erfolgte konzentrationsabhängig und konnte am effektivsten mit der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Dieses Ergebnis wird durch frühere Studien bestätigt, eine 24-stündige Nikotinstimulation führte zu einer PTHrP-Expressionsteigerung in isolierten Endothelzellen (Ruf et al., 2007).

Nikotin ist ein natürlicher Agonist am nAChR. Erfolgte die spezifische oder unspezifische Hemmung der nAChR, konnte unter Nikotinstimulation kein Anstieg der PTHrP-Expression mehr beobachtet werden. Diese Hemmung erfolgte ausgeprägter mit dem spezifischen  $\alpha 7$ -Inhibitor  $\alpha$ -Bungarotoxin als mit dem unspezifischen nAChR-Inhibitor Mecamylamin, da in den Endothelzellen hauptsächlich die  $\alpha 7$ -Untereinheit exprimiert wurde.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass der stimulierende Effekt auf die PTHrP-Expression, hervorgerufen durch Nikotin, über einen  $\alpha 7$ -nAChR-abhängigen Signalmechanismus vermittelt wird.

### 5.3 Die p38-MAP-Kinase vermittelt die nikotinerg induzierte Steigerung der PTHrP-Expression

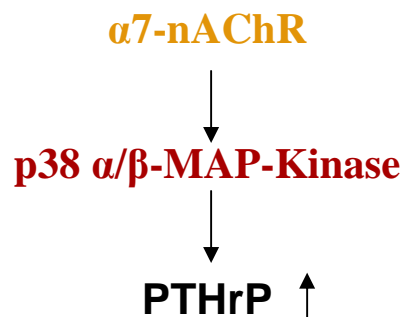
Die MAP-Kinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und sind an fast allen regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt (Chang und Karin 2001). Diese Kinasen können durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli aktiviert werden, so dass die Zellen auf die verschiedensten Signale z.B. Zytokine oder Ischämie reagieren können (Kyriakis und Avruch 2001). MAP-Kinasen sind auch in der Lage, Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen zu können (Kyriakis und Avruch 2001; Schramek 2002). Mittlerweile werden die MAP-Kinasen in drei Gruppen eingeteilt: die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK), die Jun amino terminal kinases (JNK), auch Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) genannt, sowie die p38-MAP-Kinasen. Die extrazellulär regulierten Kinasen ERK1 und ERK2 werden entsprechend ihrer Größe in kDa auch als p44 und p42 MAPK bezeichnet (Liebmann 2001). Die p38-MAP-Kinase ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinase (Oddo et al., 2005), es existieren 4 verschiedene Isoformen: p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Alonso et al., 2000).

Reguliert wird die Aktivität aller MAP-Kinasen über ein dreistufiges Kaskadensystem, bestehend aus einer MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase, oder MEK-Kinase), der MAPKK (MAP-Kinase-Kinase, MKK oder MEK) sowie der MAP-Kinase (Robinson und Cobb 1997; English et al., 1999). Aktiviert werden die einzelnen Stufen der Kaskade durch Phosphorylierung. Wang et al. konnten bereits zeigen, dass die p38-MAP-Kinase durch eine  $\alpha 7$ -nAChR Stimulierung aktiviert wird (Wang et al., 2006).

Die Aktivität der MAP-Kinasen p42 und JNK wurde durch eine Inkubation mit Nikotin nicht gesteigert. Die p38-MAP-Kinase hingegen zeigte bereits nach fünfzehn Minuten eine signifikante Zunahme der aktiven phosphorylierten Form der p38-MAP-Kinase. Die pharmakologische Hemmung der p38-MAP-Kinase erfolgte mit dem Inhibitor SB202190, dieser inhibiert nur die  $\alpha$  und  $\beta$  Isoform der p38-MAP-Kinase. Trotzdem konnte unter Einfluss dieses Inhibitors zu dem erwähnten Zeitpunkt die PTHrP-Expression durch Nikotin nicht mehr gesteigert werden.

Dieses Ergebnis verifiziert die Beteiligung der p38-MAP-Kinase an der nikotinerg induzierten Steigerung der PTHrP-Expression. Durch den verwendeten Inhibitor ist

eine genauere Charakterisierung der beteiligten p38-Isoformen möglich:  $\alpha$  und  $\beta$ . Die p38-MAP-Kinase ist in der Signalkaskade dem nAChR nachgeschaltet (Abb. 5-1)



**Abb. 5-1 Steigerung der PTHrP-Expression durch  $\alpha$ 7-nikotinerge Stimulation**

Eine Aktivierung der p38-MAP-Kinase vermittelt die  $\alpha$ 7-nAChR induzierte Zunahme der PTHrP-Expression in isolierten mikrovaskulären Endothelzellen der adulten Ratte.

## 5.4 Nikotin wirkt pro-apoptotisch auf isolierte Endothelzellen

PTHrP führt in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer gesteigerten Apoptose-resistenz (Schorr et al., 2003). In Chondrozyten erhöht PTHrP die Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2. Bcl-2 ist an dem Mechanismus der Chondrozyten-reifung beteiligt und hat so eine wichtige Funktion während der Skelettentwicklung (Amling et al., 1997).

In der vorliegenden Studie konnte die Apoptoseresistenz mikrovaskulärer Endothelzellen durch eine nikotinerge Stimulation der PTHrP-Expression nicht gesteigert werden. Durch Nikotin erhöhte sich die Apoptoserate signifikant. Dies zeigte sich sowohl im durchgeführten Apoptose-Assay als auch in der Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2. Untersuchungen auf Proteinebene und Messungen der mRNA mittels real-time RT-PCR zeigten eine signifikante Herabregulation von Bcl-2.

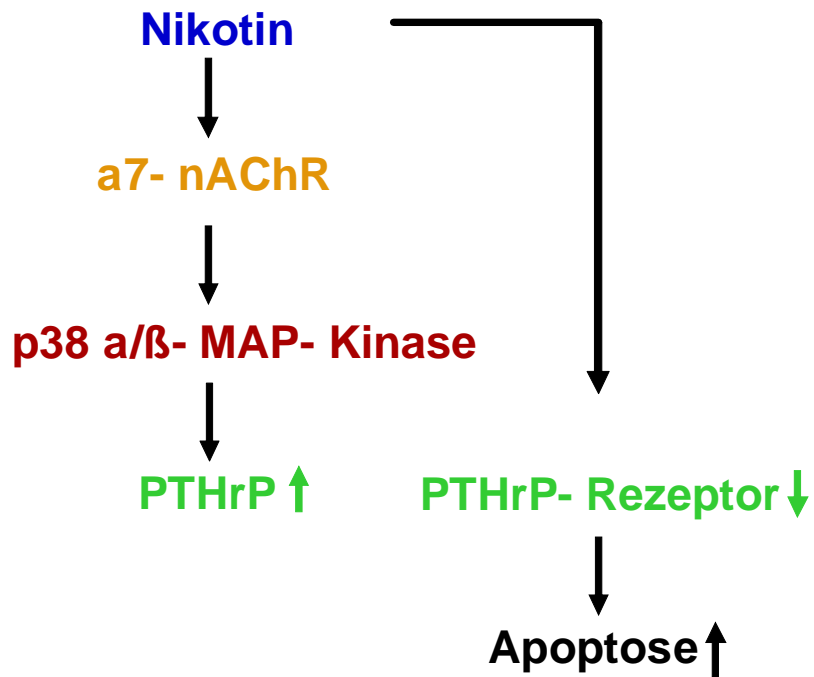
Ursächlich für die vermehrte Apoptose könnten konzentrationsabhängige Eigeneffekte des Nikotins sein. Nikotin kann auf die Endothelzellen nach 48 Stunden Inkubation zytotoxisch wirken. Villablanca et al. konnten 1998 zwei Effekte des Nikotins an isolierten Endothelzellen nachweisen: Nikotin erhöhte die DNA-Synthese und Zellproliferation bei Konzentrationen unter  $10^{-8}$  M, aber Konzentrationen höher als  $10^{-6}$  M wirkten zytotoxisch auf die Zellkulturen.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass außer einer gesteigerten Apoptose und einer verminderten Expression des Bcl-2 auch die Expression des PTHrP-Rezeptors verändert war. Es konnte eine Herabregulation des PTHrP-Rezeptors, *in vitro* und *in vivo*, nach 24 Stunden bzw. 30 Tagen Nikotinstimulation nachgewiesen werden. Die Expression des PTHrP-Rezeptors nahm nach 48 Stunden wieder zu, allerdings gab es zu diesem Zeitpunkt keine gesteigerte Expression des PTHrP mehr.

Rehan et al. konnten 2005 bereits in kultivierten Lungenfibroblasten zeigen, dass Nikotin in der Konzentration von  $10^{-6}$  M zu einer 30% Reduktion der Bindung von PTHrP an seinen Rezeptor führte. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors  $\alpha$ -Bungarotoxin verhindert werden.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression des PTHrP-Rezeptors und die des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 positiv korrelieren. Die Herabregulation des PTHrP-Rezeptors führte auch zu einer verminderten Expression des Bcl-2.

Dies ließ die Vermutung zu, dass der erhöhten Apoptoserate ein parakriner Effekt zu Grunde liegt: das vermehrt gebildete PTHrP ist nicht in der Lage seinen protektiven Effekt auszuführen, da der benötigte Rezeptor nicht ausreichend zur Verfügung steht. Außerdem kommt es zu einer Reduktion des anti-apoptotischen Gens Bcl-2, was das Gleichgewicht der pro- und anti-apoptotischen Gene zu Gunsten der pro-apoptotischen Faktoren verschiebt und die Apoptose in den Endothelzellen steigert.



**Abb. 5-2** Nikotin stimuliert die PTHrP-Expression, reguliert aber gleichzeitig den PTHrP-Rezeptor herab und führt zu einer signifikant gesteigerten Apoptose in Endothelzellen.

## 5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass in koronaren mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte eine nAChR-Aktivierung mit dem natürlichen Agonisten Nikotin die PTHrP-Expression signifikant steigert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Steigerung der PTHrP-Expression auf eine Aktivierung des  $\alpha 7$ -nAChR und eine Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase basiert.

Allerdings konnte durch die Stimulation der PTHrP-Expression keine Protektion der Endothelzellen erreicht werden. Ursächlich dafür ist eine gleichzeitige Herabregulation des PTHrP-Rezeptors, die eine verminderte Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 zur Folge hat. Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren führt zu einer gesteigerten Apoptose.

## 6 Zusammenfassung

Diese Studie sollte untersuchen, ob eine nAChR Aktivierung durch Nikotin zu einer gesteigerten PTHrP-Expression führt und dies eine Änderung der Apoptosesuszeptibilität von Endothelzellen zur Folge hat. Die Versuche wurden *in vitro* an isolierten Endothelzellen der Ratte durchgeführt.

Nikotin wird als Therapeutikum bei Demenzerkrankungen, z.B. Alzheimer, diskutiert. Die Stimulation der nAChR soll der bei dieser Erkrankung auftretenden Gefäßrarefizierung im Gehirn entgegenwirken. PTHrP senkt die Apoptose in Endothelzellen und könnte so möglicherweise in der Therapie von Erkrankungen einhergehend mit einer vermehrten Apoptoserate eine Rolle spielen.

Das Hauptergebnis dieser durchgeführten Studie ist, dass Nikotin die Apoptoserate in Endothelzellen nach 48 Stunden Inkubation signifikant erhöht. Zwar konnte unter Nikotinstimulation eine Steigerung der PTHrP-Expression in Endothelzellen erreicht werden, aber parallel dazu kam es zu einer signifikant verminderten PTHrP-Rezeptor Expression. Sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene konnte unter Nikotin eine verminderte Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 beobachtet werden. Die PTHrP-Rezeptorexpression und die Expression des Gens Bcl-2 zeigte eine positive Korrelation. Diese Ergebnisse wurden auch anhand eines *in vivo Modells* mit Spontan Hypertensiven Ratten bestätigt.

Diese Studie konnte zeigen, dass eine nAChR Aktivierung zu einer erhöhten Expression von PTHrP führt. Allerdings löst Nikotin in Endothelzellen auch eine vermehrte Apoptose aus, vermutlich durch eine korrespondierende Rezeptorherabregulation. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der autokrinen PTHrP-Bildung für die Apoptosesuszeptibilität von Endothelzellen.

## 7 Summary

It was the aim of the present study to investigate the effect of a nAChR stimulation on the PTHrP-Expression and the susceptibility of apoptosis in endothelial cells. The study was performed as an *in vitro* experiment with isolated microvascular endothelial cells from rats.

Nicotine is discussed as a therapeutic agent in degenerative diseases as Alzheimer. The stimulation of nAChR is supposed to alter the loss of microvessels in the brain. PTHrP reduces the amount of apoptosis in endothelial cells and may be helpful in the treatment of diseases with a high amount of apoptosis.

The main result of the present study is that nicotine significantly promotes apoptosis in endothelial cells after 48 hours of incubation. It was possible to increase the PTHrP-expression but in the same time nicotine significantly decreased the expression of the PTHrP-receptor. A decrease in the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2 on mRNA and protein level could also be observed. The expression of the PTHrP-receptor and the gene Bcl-2 showed a positive correlation. These results have been affirmed by an *in vivo* model of spontaneously hypertensive rats.

This study showed that a nAChR stimulation leads to an increase of PTHrP-expression. But nicotine also increases the amount of apoptosis in endothelial cells probably because of a corresponding down-regulation of the PTHrP-receptor. These results underline the importance of PTHrP for the susceptibility of apoptosis in endothelial cells.



## 8 Literaturverzeichnis

ABDALLAH Y., ROSS G., DOLF A., HEINEMANN M., SCHLÜTER K-D.

N-terminal parathyroid hormone-related peptide hyperpolarizes endothelial cells and causes a reduction of the coronary resistance of the rat heart via endothelial hyperpolarisation

*Peptides* 2006, 27: 2927-2934

ALBUQUERQUE E.X., ALKONDON M., PEREIRA E.F.R., CASTRO N.G., SCHRATTENHOLZ A., BARBOSA C.T.F., BONFANTE-CABARCAS R., ARACAVA Y., EISENBERG H.M. MAELICKE A.

Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function

*J Pharmacol Exp Ther* 1997, 280: 1117-1136

ALONSO G., AMBROSINO C., JONES M., NEBRED A.R.

Differential Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Isoforms Depending on Signal Strength

*J Biol Chem* 2000, 275 (51): 40641-40648

ALZHEIMER A.

Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde

*Allg Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtl Med* 1907, 79: 23-48

AMLING M., NEFF L., TANAKA S., INOUE D., KUIDA K., WEIR E., PHILBRICK W.M., BROADUS A.E., BARON R.

Bcl-2 lies Downstream of Parathyroid Hormone-related Peptide in a Signaling Pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development

*J Cell Biol* 1997, 136 (1): 205-213

ARENDS M.J., MORRIS R.G., WYLLIE A.H.

Apoptosis: The role of the endonuclease

*Am J Pathol* 1990, 136(3): 593-608

ASHKENAZI A., DIXIT V.M.

Death receptors: signaling and modulation

*Science* 1998, 281(5381): 1305-1308

BENOWITZ N.L.

Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics

*Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996, 36: 597-613

BOLLIGER A-P., GRAHAM P.A., RICHARD V., ROSOL T.J., NACHREINER R.F., REFSAL K.R.

Detection of parathyroid hormone-related protein in cats with humoral hypercalcemia of malignancy

*Vet Clin Pathol* 2002, 31(1): 3-8

BORTNER C.D., OLDENBURG N.B., CIDLOWSKI J.A.

The role of DNA fragmentation in apoptosis

*Trends Cell Biol* 1995, 5(1): 21-26

BRATTON D.L., FADOK V.A., RICHTER D.A., KAILEY J.M., GUTHRIE L.A., HENSON P.M.

Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase

*J Biol Chem* 1997, 272(42): 26159-26165

BRÜGGMANN D., LIPS K.S., PFEIL U., HABERBERGER R.V., KUMMER W.

Multiple nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha$ -subunits are expressed in the arterial system of the rat

*Histochem Cell Biol* 2002, 118: 441-447

BUISSON B., PICARD F., BERTRAND D.

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from biophysical properties to human diseases

*Clementi F., Gotti C., Fornasari D. (eds.) Neuronal nicotinic receptors; Springer Berlin Heidelberg New York, 272-299*

BURGHHAUS L., SCHUTZ U., KREMPEL U., DE VOS R.A., JANSEN STEUR E.N., WEVERS A., LINDSTROM J., SCHRODER H.

Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients

*Brain Res Mol Brain Res* 2000, 76(2): 385-388.

BURTIS W.J., WU T., BUNCH C., WYSOLMERSKI J.J., INSOGNA K.L., WEIR E.C., BROADUS A.E., STEWART A.F.

Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy

*J Biol Chem* 1987, 262(15): 7151-7156

BURTON D.W., BRANDT D.W., DEFTOS L.J.

Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system

*Endocrinology* 1994, 135(1):253-261

CHANG L., KARIN M.

Mammalian MAP kinase signalling cascades

*Nature* 2001, 410(6824): 37-40

CHINNAIYAN A.M.

The apoptosome: heart and soul of the cell death machine

*Neoplasia* 1999, 1: 5-15

COHEN J.J.

Apoptosis: the physiologic pathway of cell death

*Hosp Pract (Off Ed)* 1993, 28(12): 35-43

COHEN G.M.

Caspases: the executioners of apoptosis

*Biochem J* 1997, 326(Pt1): 1-16

CORY S., ADAMS J.M.

The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch

*Nat Rev Cancer* 2002, 2: 647-656

DASGUPTA P., RASTOGI S., PILLAI S., ORDONEZ-ERCAN D., MORRIS M., HAURA E., CHELLAPPAN S.

Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways

*J Clin Invest* 2006, 116(8): 2208-2217

DEGENHARDT H., SCHLÜTER K-D.

The role of parathyroid hormone-related peptide in endothelium dependent regulation of cardiac function

*Peptide & Protein Research* 2004, 6: 105-113

DUJIN C., HOFMAN A.

Relation between nicotine intake and Alzheimer`s disease

*BMJ* 1991, 302: 1491-1494

ELMORE S.

Apoptosis: A review of programmed cell death

*Toxicol Pathol* 2007, 35(4): 495-516

ENGLISH J., PEARSON G., WILSBACHER J., SWANTEK J., KARANDIKAR M., XU S., COBB M.H.

New insights into the control of MAP kinase pathways

*Exp Cell Res* 1999, 253(1): 255-270

GIROUARD H., IADECOLA C.

Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke and Alzheimer disease

*J Appl Physiol* 2006, 100: 328-335

GOEDERT M., SPILLANTINI M.G., CROWTHER R.A.

Tau proteins and neurofibrillary degeneration

*Brain Pathol* 1991, 1(4): 279-286

GÖTZ C.

Apoptosemechanismen und neurodegenerative Erkrankungen-Die Alzheimer Demenz

[http://www.walt.med-rz.uni-sb.de/med\\_fak/biochemie/Apo07.pdf](http://www.walt.med-rz.uni-sb.de/med_fak/biochemie/Apo07.pdf)

GÜNTHER T., CHEN Z-F., KIM J., PRIEMEL M., RUEGER J.M., AMLING M., MOSELEY J.M., MARTIN T.J., ANDERSON D.J., KARSENTY G.

Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone

*Nature* 2000, 406: 199-203

GRUTZENDLER J., MORRIS J.C.  
Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease  
*Drugs* 2001, 61(1): 41-52

HAKKI A., FRIEDMAN H., PROSS S.  
Nicotine modulation of apoptosis in human coronary artery endothelial cells  
*Int Immunopharmacol* 2002, 10: 1403-1409

HEESCHEN C., JANG J.J., WEIS M., PATHAK A., KAJI S., HU R.S., TSAO P.S., JOHNSON F.L., COOKE J.P.  
Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis  
*Nature Med* 2001, 7: 833-839

HEESCHEN C., WEIS M., AICHER A., DIMMLER S., COOKE J.P.  
A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors  
*J Clin Invest* 2002, 110: 527-536

HEESCHEN C., CHANG E., AICHER A., COOKE J.P.  
Endothelial Progenitor cells participate in nicotine-mediated Angiogenesis  
*J AM Coll Cardiol* 2006; 48(12): 2553-2560

HENGARTNER M.O.  
The biochemistry of apoptosis  
*Nature* 2000, 407(6805): 770-776

HIGUCHI R., FOCKLER C., DOLLINGER G., WATSON R.  
Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.  
*Biotechnology (N Y)* 1993, 11: 1026-1030

HILL M.M., ADRAIN C., DURIEZ P.J., CREAGH E.M., MARTIN S.J.  
Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes  
*Embo J* 2004, 23: 2134-2145

IBACH B., HAEN E.  
Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease  
*Curr Pharm Des* 2004, 10(3): 231-251

IGNEY F.H., KRAMMER P.H.  
Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis  
*Nat Rev Cancer* 2002, 27: 409-420

JANSEN J., GRES P., UMSCHLAG C., HEINZEL F.R., DEGENHARDT H., SCHLÜTER K-D., HEUSCH G., SCHULZ R.  
Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 284: H49-55

JOHN U., HANKE M.

Tobacco smoking attributable mortality in Germany  
*Gesundheitswesen* 2001, 63(6): 363-369.

KANG P.M., IZUMO S.,

Apoptosis and heart failure: a critical review of the literature  
*Circ Res* 2000, 86: 1107-1113

KATZMAN R.

Alzheimer's disease  
*N Engl J Med* 1986, 314(15): 964-973

KERNEKEWITSCH M.

Untersuchungen zur Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und zur Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP in Astrozyten  
*Dissertation Fach Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin* 1999

KERR J.F., WYLLIE A.H., CURRIE A.R.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics  
*Br J Cancer* 1972, 26(4): 239-257

KRAMMER P.H.

CD95's deadly mission in the immune system  
*Nature* 2000, 407: 789-795

KROEMER A., DALLAPORTA B., RESCHE-RIGON M.

The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis  
*Annu Rev Physiol* 1998, 60: 619-642

KUBOTA A., KANO R., MIZUNO T., HISASUE M., MOORE P.F., WATARI T., TSUJIMOTO H., HASEGAWA A.

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) produced by dog lymphoma cells  
*J Veterinary Medical Science* 2002, 64: 835-837

KUROSAKA K., TAKAHASHI M., WATANABE N., KOBAYASHI Y.

Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages  
*J Immunol* 2003, 171(9): 4672-4679

KYRIAKIS J.M., AVRUCH J.

Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation  
*Physiol Rev* 2001, 81(2): 807-869

LIEBMANN C.

Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity  
*Cell Signal* 2001, 13(11): 777-785

LINDSTROM J.

The structures of neuronal nicotinic receptors

*Clementi F., Gotti C., Fornasari D. (eds.) Neuronal nicotinic receptors; Springer Berlin Heidelberg New York 2000, 101-162*

LIPS K.S., BRÜGGMANN D., PFEIL U., VOLLERTHUN R., GRANDO S.A., KUMMER W.

Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat and Human Placenta

*Placenta 2005, 26(10): 735-746*

LOCKSLEY R.M., KILLEEN N., LENARDO M.J.

The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology

*Cell 2001, 104: 487-501*

LÜTTEKE J., ROSS G., ABDALLAH Y., SCHÄFER C., PIPER H.M., SCHLÜTER K-D.

Parathyroid hormone-related peptide improves contractile responsiveness of adult rat cardiomyocytes with depressed cell function irrespectively of oxidative inhibition

*Basic Res Cardiol 2005, 100: 320-327*

MACKLIN K.D., MAUS A., PEREIRA E.F.R., ALBUQUERQUE E.X., CONTI-FINE B.M

Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors

*J Pharmacol Exp Ther 1998, 287(1): 435-439*

MASSFELDER T., HELWIG J.J.

The parathyroid hormone-related protein system: more data but more unsolved questions

*Curr Opin Nephrol Hypertens 2003, 12(1): 35-42*

MAUS A.D., PEREIRA E.F., KARACHUNSKI P.I., HORTON R.M., NAVANEETHAM D., MACKLIN K., CORTES W.S., ALBUQUERQUE E.X., CONTI-FINE B.M.

Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors

*Mol Pharmacol 1998, 54: 779-797*

MEURRENS K., RUF S., ROSS G., SCHLEEF R., VON HOLT K., SCHLÜTER K-D.

Smoking accelerates the progression of hypertension-induced myocardial hypertrophy to heart failure in spontaneously hypertensive rats

*Cardiovasc Res 2007, 76: 311-322*

MOCCIA F., FROST C., BERRA-ROMANI R., TANZI F., ADAMS D.J.

Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells

*Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004, 286(2): H486-H491*

MOSELEY J.M., KUBOTA M., DIEFENBACH-JAGGER H., WETTENHALL R.E., KEMP B.M., SUVA L.J., RODDA C.P., EBELING P.R., HUDSON P.J., ZAJAC J.D.

Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line

*Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84: 5048-5052*

- NAKAYAMA H., NUMAKAWA T., IKEUCHI T., HATANAKA H.  
Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells  
*J Neurochem* 2001, 79: 489-498
- NEUBAUER S., WELTE R., BEICHE A., KOENIG H.H., BUESCH K., LEIDL R.  
Mortality, morbidity and costs attributable to smoking in Germany: update and a 10-year comparison  
*Tobacco Control* 2006, 15: 464-471
- NICKOLS G.A., NANA A.D., NICKOLS M.A., DIPETTE D.J., ASIMAKIS G.K.  
Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor  
*Endocrinology* 1989, 125(2): 834-841
- NODA M., KATOH T., TAKUWA N., KUMADA M., KUOKAWA K., TAKUWA Y.  
Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells  
*J Biol Chem* 1994, 269: 17911-17917
- NODA, M., KATOH T., KUOKAWA K., TAKUWA Y.  
Increased expression of parathyroid hormone-related peptide gene in blood vessels of spontaneously hypertensive rats  
*Hypertension* 1997, 30(5): 1284-1288
- NORDBERG A., HELLSTROM-LINDAHL E., LEE M., JOHNSON M., MOUSAVI M., HALL R., PERRY E., BEDNAR I., COURT J.  
Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw)  
*J Neurochem* 2002, 81(3): 655-658
- ODDO S., CACCAMO A., GREEN K.N., LIANG K., TRAN L., CHEN Y., LESLIE F.M., LAFERLA F.M.  
Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(8): 3046-3051
- O'NEILL M.J., MURRAY T.K., LAKICS V., VISANJI N.P., DUTY S.  
The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration  
*Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2002, 1(4):399-411
- OKADA H., MAK T.W.  
Pathways of Apoptotic and Non-Apoptotic Death in Cancer  
*Nat Rev Cancer* 2004, 4(8): 592-603
- PATEDER D.B., ROSIER R.N., SCHWARZ E.M., REYNOLDS P.R., PUZAS J.E., D'SOUZA M., O'KEEFE R.J.  
PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes  
*Exp Cell Res* 2000, 256: 555-562

Patientenleitlinien/Demenz  
Universität Witten/Herdecke

<http://www.patientenleitlinien.de/Demenz/demenz.html>

PETO R.

Smoking and death: the past 40 years and the next 40  
*BMJ* 1994, 309(6959): 937-939

PFAFFL M.W.

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR  
*Nucleic Acids Research* 2001, 29(9): 2001-2007

PICCIOTTO M.R., ZOLI M.

Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease  
*Front Biosci* 2008, 13: 492-504.

PIROLA C.J., WANG H.M., KAMYAR A., WU S., ENOMOTO H., SHARIFI B., FORRESTER J.S., CLEMENS T.L., FAGIN J.A

Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms

*J Biol Chem* 1993, 268:1987-1994

PIROLA C.J., WANG H.M., STRGACICH M.I., KAMYAR A., CERCEK B., FORRESTER J.S., CLEMENS T.L., FAGIN J.A

Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein gene expression in vivo and in vitro

*Endocrinology* 1994, 134: 2230-2236

QIAN J., LORENZ J.N., MAEDA S., SUTLIFF R.L., WEBER C., NAKAYAMA T., COLBERT M.C., PAUL R.J., FAGIN J.A., CLEMENS T.L.

Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle

*Endocrinology* 1999, 140(4): 1826-1833

RAI N.K., TRIPATHI K., SHARMA D., SHUKLA V.K.

Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing

*Int J Low Extrem Wounds* 2005, 4: 138-144

REHAN V.K., WANG Y., SUGANO S., ROMERO S., CHEN X., SANTOS J., KHAZANCHI A., TORDAY J.S.

Mechanism of nicotine-induced pulmonary fibroblast transdifferentiation

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, 289: L667-L676

REISBERG B., LONDON E., FERRIS S.H., ANAND R., DE LEON M.J.

Novel pharmacologic approaches to the treatment of senile dementia of the Alzheimer's type (SDAT)

*Psychopharmacol Bull* 1983, 19(2): 220-225



ROBINSON M.J., COBB M.H.

Mitogen-activated protein kinase pathways

*Curr Opin Cell Biol* 1997, 9(2): 180-186

ROSENGARTEN B., PAULSEN S., MOLNAR S., KASCHEL R., GALLHOFER B., KAPS M.

Acetylcholine esterase inhibitor donepezil improves dynamic cerebrovascular regulation in Alzheimer patients

*J Neurol* 2006, 253: 58-64

ROSS G., ENGEL P., ABDALLAH Y., KUMMER W., SCHLÜTER K-D.

Tuberoinfundibular peptide of 39 residues: a new mediator of cardiac function via nitric oxide production in the rat heart

*Endocrinology* 2005, 146(5): 2221-2228

RUBIN D.A., JUPPNER H.

Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide

*J Biol Chem* 1999, 274: 28185-28190

RUF S.

Einfluss subchronischer Rauchbelastung auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie

*Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen* 2007

SANDBORN W.J.,

Nicotine therapy for ulcerative colitis: a review of rationale, mechanisms, pharmacology, and clinical results

*Am J Gastroenterol* 1999, 94(5): 1161-1171

SAVILL J., FADOK V.

Corpse clearance defines the meaning of cell death

*Nature* 2000, 407(6805): 784-788

SCHLÜTER K-D., PIPER H.M.

Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes

*Am J Physiol* 1992, 263: H1739-1746

SCHLÜTER K-D., WEBER M., PIPER H.M.

Effects of PTHrP(107-111) and PTHrP(7-34) on adult cardiomyocytes

*J Mol Cell Cardiol* 1997, 29: 3057-3065

SCHLÜTER K-D., PIPER H.M.

Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide

*Cardiovasc Res* 1998, 37: 34-41

SCHLÜTER K-D., KATZER C., FRISCHKOPF K., WENZEL S., TAIMOR G., PIPER H.M.  
Expression, release and biological activity of parathyroid hormone-related peptide  
from coronary endothelial cells  
*Circ Res* 2000, 86: 946-951

SCHLÜTER K-D., SCHREIBER, D.  
Adult Ventricular Cardiomyocytes- Isolation and culture  
*Methods Mol. Biol* 2005, 290: 305-314

SCHLÜTER K-D., ROSS G.  
Intrakrine, parakrine und autokrine Funktionen des PTH/PTHrP-Systems  
*Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*,  
Springer Verlag Berlin Heidelberg 2006, 127-152

SCHORR K., TAIMOR G., DEGENHARDT H., WEBER K., SCHLÜTER K-D.  
Parathyroid Hormone-related Peptide is induced by stimulation of  $\alpha_{1A}$ -Adrenoceptors  
and improves resistance against Apoptosis in Coronary Endothelial Cells  
*Mol Pharmacol* 2003, 63: 111-118

SCHRAMEK H.  
MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease  
*News Physiol Sci* 2002, 17: 62-67

SEGUELA P., WADICHE K., DINELEY-MILLER K., DANI J.A., PATRICK J.W.  
Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a  
nicotinic cation channel highly permeable to calcium  
*J Neurosci* 1993, 13(2): 596-604

SHARMA G., VIJAYARAGHAVAN S.  
Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells  
*J Neurobiol* 2002, 53: 524-534

STEINBACH J.H.  
Mechanism of action of the nicotinic acetylcholine receptor  
*G.Bock and J Marsh, editors; John Wiley and Sons Ltd. New York 1990, The Biology  
of Nicotine Dependence Vol.152: 53-61*

STREWLER G.J., NISSENSON R.A.  
Nonparathyroid hypercalcemia  
*Adv Intern Med* 1987, 32: 235-258

STREWLER G.J., STERN P.H., JACOBS J.W., EVELOFF J., KLEIN R.F., LEUNG S.C.,  
ROSENBLATT M., NISSENSON R.A.  
Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells structural and  
functional homology with parathyroid hormone  
*J Clin Invest* 1987, 80(6): 1803-1807

SUZUKI J., BAYNA E., MOLLE E.D., LEW W.Y.W.  
Nicotine inhibits cardiac apoptosis induced by Lipopolysaccharide in rats  
*J AM Coll Cardiol* 2003, 41(3): 482-488

TROJANKOWSKI J.Q., LEE V.M-Y.

Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. The kinase connection  
*Am J Pathol* 1994, 144: 449-453

VILLABLANCA A.

Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro

*J Appl Physiol* 1998, 84(6): 2089-2098

VERNINO S., ROGERS M., RADCLIFFE K., DANI J.

Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors

*J Neuroscience* 1994, 14: 5514-5524

WANG Y., PEREIRA E.F., MAUS A.D., OSTLIE N.S., NAVANEETHAM D., LEI S., ALBUQUERQUE E.X., CONTI-FINE B.M.

Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors

*Mol Pharmacol* 2001, 60(6): 1201-1209.

WANG Y., WANG Z., ZHOU Y., LIU L., ZHAO Y., YAO C., WANG L., QIAO Z.

Nicotine stimulates adhesion molecular expression via calcium influx and mitogen-activated protein kinases in human endothelial cells

*Int J Biochem & Cell Biol* 2006, 38: 170-182

WENZEL S, SCHORR K, DEGENHARDT H, FRISCHKOPF K, KOJDA G., WIESNER R.J., ROSENKRANZ S., PIPER H.M., SCHLUTER K-D.

TGF-beta(1) downregulates PTHrP in coronary endothelial cells

*J Mol Cell Cardiol* 2001, 33(6): 1181-1190

WERKMEISTER J.R., BLOMME E.A., WECKMANN M.T., GRONE A., MC CAULEY L.K., WADE A.B., O'ROURKE J., CAPEN C.C., ROSOL T.J.

Effect of transforming growth factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein secretion and mRNA expression by normal human keratinocytes in vitro

*Endocrine* 1998, 8(3): 291-299.

WEVERS A., MONTEGGIA L., NOWACKI S., BLOCH W., SCHUTZ U., LINDSTROM J., PEREIRA E.F., EISENBERG H., GIACOBINI E., DE VOS R.A., STEUR E.N., MAELICKE A., ALBUQUERQUE E.X., SCHRODER H.

Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein

*Eur J Neurosci* 1999, 11(7): 2551-2565

WEVERS A., SCHRODER H.

Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease

*J Alzheimers Dis* 1999, 1: 207-219

WOOLF N.J.

The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis

*Neurobiol Learn Mem* 1996, 66(3): 258-266.

YANG E., ZHA J., JOCKEL J., BOISE LH., THOMPSON CB, KORSMEYER SJ.

Bad, a heterodimeric partner for Bcl-Xl and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death

*Cell* 1995, 80: 285-291

YASUI T., UEMURA H., IRAHARA M., AONO T.

Effects of transforming growth factor-beta on the production of parathyroid hormone-related peptide in a human ovarian cancer cell line in vitro

*J Obstet Gynaecol Res* 1997, 23(3): 231-238.

## 9 Danksagung

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Anregung zu dieser Arbeit, insbesondere für seine ständige Gesprächsbereitschaft und seine positive Sicht der Dinge
- Herrn Prof. Dr. J. Roth für die unkomplizierte Betreuung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin
- Prof. Dr. Dr. H.M. Piper für kritische Anregungen und hinterfragen der Ergebnisse
- Dr. R. Schreckenbergr für seine Unterstützung und Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit
- allen Technischen Assistenten des Physiologischen Institutes für die nette Einarbeitung und Hilfsbereitschaft
- PD T. Noll für die Leitung des Graduiertenkollegs
- und natürlich den anderen Doktoranden des Physiologischen Institutes für das gute Arbeitsklima und gelegentliche gemeinsame Aktivitäten in den zwei Jahren.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5430-X



9 783595 430441



© Bocos Benedict - Fotolia.com